



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

Mecanismos de resistencia primaria y adquirida a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo

TESIS DOCTORAL

SANDRA ZAZO HERNÁNDEZ

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Mecanismos de resistencia primaria y adquirida a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

Sandra Zazo Hernández

Licenciada en Biología,

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:

Dr. Federico Rojo Todo

Dr. Félix Manzarbeitia Arambarri

Instituto de Investigación Sanitaria- Fundación Jiménez Díaz

Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica

El **Dr. Federico Rojo Todo**, jefe del Servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz, e investigador principal del Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica del IIS-FJD y el **Dr. Félix Manzarbeitia Arambarri**, Director de Anatomía Patológica del grupo Quiron Salud Madrid.

CERTIFICAN:

Que **Sandra Zazo Hernández**, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado: **“Mecanismos de resistencia primaria y adquirida a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo”** en el Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser valorado por el tribunal correspondiente.

Para que conste a todos los efectos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmamos la presente autorización para la defensa de esta Tesis Doctoral en Madrid a ocho de mayo de dos mil diecisiete.

Dr. Federico Rojo Todo

Dr. Félix Manzarbeitia Arambarri

Esta Tesis Doctoral, realizada en el Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica del IIS-Fundación Jiménez Díaz, y dirigida por los doctores Federico Rojo Todo y Félix Manzarbeitia Arambarri, ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III-Fondos de Investigaciones Sanitarias PI12/01552 y PI15/00934.

A mis padres

A Pablo

Agradecimientos

Después de muchos meses escribiendo y recopilando gran parte del trabajo de estos últimos años, me doy cuenta de que esta tesis ha sido posible gracias a la ayuda y apoyo de mucha gente a la cual quiero agradecer su esfuerzo y dedicación en este tiempo.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores la oportunidad que me han brindado de poder realizar este trabajo. Gracias a Félix por darme la oportunidad de formar parte del servicio de anatomía, tu me entrevistaste y confiaste en mi para comenzar como becario del que sería el actual laboratorio de patología molecular hace ya casi 10 años. Gracias a Fredi, por tener tanta paciencia al principio, por hacer que me apasione el mundo de la patología molecular y la anatomía patología, y por todo lo aprendido de ti estos años, haces que sea muy fácil trabajar contigo.

Gracias a Nuria, por apoyarme tanto al principio cuando hacíamos las PCRs entre las dos porque no había suficiente trabajo para dos personas (esta frase te acompañara siempre), me has enseñado mucho. Gracias a Juan, por tu paciencia en mis momentos de desesperación con los blots y por ver siempre la parte positiva de las cosas. Gracias a Bragado porque esos malos momentos me ayudaron a madurar y a hacerme fuerte. Gracias a Raúl por lo divertido que ha sido trabajar contigo, porque nunca has perdido la sonrisa aunque nuestros experimentos fueran un desastre. Gracias a Cris, por estar ahí siempre, por ayudarme tantas veces y por enseñarme tanto; tu optimismo me ha ayudado mucho a continuar con la investigación y ver que poco a poco van saliendo cosas. Nos quedan muchas charlas sobre posibles diseños e hipótesis de trabajo a horas intempestivas, así que vuelve pronto. Gracias a Laura por ser la más racional de todas, sin ti estaríamos en crisis continuamente, gracias por tu impecable trabajo. Gracias a Nere por tu apoyo estos meses de locura, por escucharme; es un placer trabajar contigo, estoy deseando aprender de ti en complejo mundo de la NGS. Gracias a Vir, por tu excelente trabajo y tu profesionalidad por tu dedicación a calidad. Gracias a Almu porque trabajas de maravilla siempre con una sonrisa. Gracias a Iván por tu pulcro trabajo, es un placer poder aprender de ti. Gracias a Jenny por haberme ayudado tanto con todo lo que te he pedido, y por ser la mejor con la secuenciación. Gracias a todos porque hacéis que sea muy sencillo trabajar en el labo patología molecular.

Gracias a Ester, por su tenacidad y espíritu investigador, por insistir cuando yo ya había tirado la toalla y ayudarme tanto tanto cuando yo no llegaba a más. Gracias a Paula, por tu estupendo trabajo, por hacer que sea muy fácil trabajar en equipo, y por haber podido consolarnos la una a la otra. Gracias a Lina, por ayudarme a relativizar la tesis, por tu disponibilidad para ayudarme en lo que necesitara. Gracias a Rebeca por lo trabajadora que eres, por dedicación y esfuerzo,

Agradecimientos

por ayudarme con las cosas del papeleo. Gracias a Ion porque me has brindado tu ayuda en todo momento. Gracias a todos por tantos momentos buenos en el labo.

Gracias a todo el departamento de anatomía patológica por acogerme y enseñarme mucho. Gracias a Carmela porque has tenido mucha paciencia conmigo y con todo lo que te pedía y te pedimos en molecular, es un placer trabajar contigo por tu profesionalidad y excelente trabajo. Gracias a Belén por haberme ayudado tantas veces y facilitarme las cosas, gracias por un trabajo bien hecho.

Finalmente quiero agradecer este trabajo a mi familia, sin la cual no habría sido posible. Gracias a mis padres por haberme dado la educación que me han dado, por apoyarme siempre en mis decisiones; gracias por no dejarme que abandonara la carrera de biología y ayudarme a continuar, por arroparme los primeros meses cuando entre a trabajar en anatomía. Siempre habéis creído que conseguiría terminar la tesis, gran parte es gracias a vosotros. Gracias a Fer, tu tenacidad ante la vida y el trabajo, me ha ayudado a continuar en muchos momentos. Os quiero.

Gracias a Pablo, por todos estos meses de locura en los que he estado muy ausente, muchas gracias por estar ahí, por apoyarme, por comprenderme, por tener una paciencia infinita y por creer que sería capaz. Te quiero.

Índice

Abreviaturas	1
Resumen.....	9
Summary.....	15
Introducción	21
1. Cáncer de mama.....	23
1.1. Epidemiología	23
1.2. Morfología del cáncer de mama como herramienta diagnóstica.....	24
1.3. Marcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama	29
1.4. Clasificación molecular del cáncer de mama.....	33
1.5. Perfiles moleculares en cáncer de mama: Valor pronóstico y predictivo.....	35
1.6. Tratamiento del cáncer de mama.....	36
1.7. Alteraciones moleculares en cáncer de mama.....	41
2. Cáncer de mama HER2 positivo	45
2.1 Señalización celular mediada por receptor HER2	45
2.1 Mecanismos de acción de la terapia anti-HER2.....	47
2.3 Resistencia a trastuzumab	47
Hipótesis y objetivos.....	53
Hipótesis.....	55
Objetivos principales	55
Sub-objetivos	55
Material y métodos	57
1. Líneas celulares de cáncer de mama	59
2. Ensayos celulares.....	60
2.1 Reactivos	60
2.2 Estudios de viabilidad celular mediante técnicas de MTS	61
2.3 Valoración de sensibilidad a fármacos en líneas de cáncer de mama	61
2.4 Generación de líneas celulares de cáncer de mama resistentes a trastuzumab (resistencia adquirida).....	62
2.5 Ensayo clonogénico	62
2.6 Silenciamiento transitorios de genes de interés en líneas celulares.....	63
3. Ensayos moleculares.....	64
3.1. Extracción de ADN	64
3.2. Extracción de ARN	65

3.3.	Control de calidad de ARN	66
3.4.	Síntesis de ADNc	66
3.5.	Análisis de perfiles de expresión a partir de la base de datos Cancer Cell Encyclopedia 67	
3.6.	Análisis de perfiles de expresión génica por microarrays	67
3.7.	PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).....	68
3.8.	Extracción de proteínas	70
3.9.	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y Western Blot.....	70
3.10.	Ensayo de array de anticuerpos anti fosfo-tirosina-quinasa.....	72
3.11.	Inmunohistoquímica.....	74
3.12.	Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)	76
3.13.	ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).....	77
4.	Muestras de pacientes de cáncer de mama	78
5.	Modelo murino de cáncer de mama HER2 +	80
6.	Estadística	81
	Resultados	85
1.	Caracterización de líneas celulares y medida del efecto de trastuzumab.....	87
1.1	Selección de la concentración de TZM	87
1.2	Evaluación de la sensibilidad a trastuzumab en líneas de cáncer de mama HER2 +..	87
2.	Resistencia primaria a trastuzumab.....	89
3.	Resistencia adquirida a trastuzumab	94
3.1	Generación de líneas de cáncer de mama HER2 positivas con resistencia secundaria a trastuzumab.....	94
3.2	Confirmación in vivo del modelo de cáncer de mama HER2 positivo resistente a trastuzumab	99
3.3	Caracterización de las líneas celulares de cáncer de mama HER2 con resistencia adquirida a trastuzumab.....	103
3.4	Valoración de perfiles de expresión génica mediante microarrays de las líneas de cáncer de mama HER2 con resistencia adquirida a trastuzumab	113
4.	Implicación de CCL5 en la resistencia adquirida a trastuzumab	118
4.1	CCL5 y resistencia adquirida en modelos in vitro	118
4.2	Expresión de CCL5 en cáncer de mama HER2 positivo. Significado clínico.....	129
5.	Terapias combinada trastuzumab e inhibidores de la ruta de señalización celular PI3K/AKT/mTOR	148
5.1	Determinación de la IC50 de inhibidores de la ruta PI3K/AKT/mTOR.....	148

5.2	Valoración del efecto de la terapia combinada de inhibidores de mTOR y trastuzumab	152
5.3	Efecto molecular del tratamiento combinado de INK128 y trastuzumab.....	158
	Discusión.....	167
1.	Sensibilidad a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo	169
2.	Resistencia primaria a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo	170
3.	Resistencia adquirida a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo	173
3.1	Papel de las citoquinas en cáncer de mama.....	173
3.2	Implicación de CCL5 en la resistencia adquirida a trastuzumab	174
3.3	Significado clínico de CCL5 en cáncer de mama	176
4.	Terapias combinada trastuzumab e inhibidores de la ruta de señalización celular PI3K/AKT/mTOR	178
4.1	Efecto celular del tratamiento combinado de everolimus más trastuzumab.....	179
4.2	Efecto celular del tratamiento combinado de BEZ235 más trastuzumab.....	181
4.3	Efecto celular y molecular del tratamiento combinado de INK128 más trastuzumab	182
	Conclusiones.....	187
	Bibliografía.....	193
	Anexos	215

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
Δ GR	Ratio de proliferación
AC	Adenocarcinoma
aCGH	Arrays comparativos de hibridación genómica
ADCC	Citotoxicidad mediada por anticuerpos
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AI	Inhibidor de aromatasa
AJCC	American Joint Committe on Cancer
AKT	Proteína quinasa B
ALP	Fosfatasa Alcalina
AR	Anfiregulina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNsi	ARN pequeño de interferencia
ASCO	Asociación americana de oncología clínica
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosil tri-fosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BCCLs	Breast cancer cells lines
C8orf4	Marco de lectura abierto 4 del cromosoma 8
CAP	Colegio americano de patólogos
CC3	Cleaved-caspasa-3
CCL5	C-C Quimioquina ligando 5
CCL5r	CCL5 recombinante
CCLE	Broad-Novartis Cancer Cell Line Encyclopedia
CCNE2	Ciclina-E 2
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CEP17	Centrómero del cromosoma 17
CLI	Carcinoma lobulillar infiltrante
c-MET	Receptor del factor de crecimiento hepático
CNAs	Copy number alterations
Cp	Crossing point
CXCL10	C-X-C Quimioquina 10
CXCL11	C-X-C Quimioquina 11
DAB	Diaminobencidina
DM-1	Emtansina
DMEM-F12	Medio esencial de Dulbecco modificado F12
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSMZ	German Tissue Repository
Duc.Ca	Ductal carcinoma
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético

EGF	Factor de crecimiento epidérmico humano
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMA	European Medicine Agency
EMT	Transición epitelio mesénquima
EPG	Epiregulina
ErbB2	Gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
FDA	Agencia de Medicamentos y Alimentos
FDR	False Discovery Rate
FFPE	Tejido fijado en formaldehído y embebido en parafina
FGFR1	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1
FISH	Hibridación in situ fluorescente
Fw	Primer Forward
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GSEA	Enriquecimiento del conjunto de genes (Gene Set enrichment)
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina
HE	Hematoxilina y eosina
HER1	Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER3	Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER4	Receptor 4 del factor de crecimiento epidérmico humano
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC50	Concentración para el 50% de inhibición
IDC	Invasive ductal carcinoma
IFI44	Proteína inducida por interferón 44
IFI44L	Proteína inducida por interferón 44- like
IFI6	Proteína inducida por interferón 6
IFIT2	Proteína Inducida Por Interferón Con Repeticiones Tetratricopeptídicas 2
IFIT3	Proteína Inducida Por Interferón Con Repeticiones Tetratricopeptídicas 3
IFN	Interferón
IGFs	Factores de crecimiento de insulina
IgG1	Inmunoglobulina G1
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
IL6	Interleuquina 6
IMIM	Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques
ISH	Hibridación in situ
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal

mAb	Anticuerpo monoclonal
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MC	Carcinoma metaplásico (metaplastic carcinoma)
MMP9	Metaloproteasa 9
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
mTORC1	Complejo 1 sensible a rapamicina en células de mamífero
mTORC2	Complejo 2 sensible a rapamicina en células de mamífero
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4- sulfofenil)-2H-tetrazolio
mut	Mutante
MVC	Maraviroc
MYC	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NK	Natural killer
NRG	Neuregulina
NRpC	No respuesta patológica completa
NSAPB	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
OAS1	2'-5'-Oligoadenilate Sintetasa 1
OASL	2'-5'-Oligoadenylate Sintetasa Like
OMS	Organización mundial de la salud
P.Br	Primary breast
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAM50	Análisis de predicción por array 50
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDP1	Piruvato fosfatasa deshidrogenasa tipo 1
PDPC1	Subunidad catalítica 1 de piruvato fosfatasa deshidrogenasa
PE	Efusión pleural (pleural effusion)
p-H3	Fosfo histona 3
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PK	Proteinasa K
pRB	Fosfo proteína del retinoblastoma
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RAS	Ras Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
RE	Receptor de estrógenos
RGS22	Regulador de la proteína G señalizadora 22
RIN	RNA Integrity Number
RMA	Promedio robusto de multiarray (Robust multiarray average)

RP	Receptor de progesterona
RpC	Respuesta patológica completa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RTKs	Receptores tirosina quinasa
RT-PCR	Retro transcriptasa-reacción en cadena de la polimerasa
Rv	Primer Reverse
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEAP	Sociedad española de anatomía patológica
SEOM	Sociedad española de oncología médica
Ser	Serina
SERM	Modulador selectivo de receptor de estrógenos
SG	Supervivencia global
siCCL5	Silenciamiento de CCL5
siCT	Silenciamiento control
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SLP	Supervivencia libre de progresión
SNAI2	Represor transcripcional 2 de la familia SNAIL
STK3	Quinasa Serina/Treonina 3
TCGA	The cancer genoma atlas
T-DM1	Trastuzumab-emtansina
TGF	Factor de crecimiento transformante
Thr	Treonina
Thy	Tirosina
TMA	Tissue micro array
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNM	Tumor, ganglio y metástasis
UBR5	Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 5
UPLs	Universal Probe Library
WB	Western blot
wt	Wild type

Resumen

El cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres en países occidentales. No obstante, en los últimos años la detección precoz, los avances diagnósticos y terapéuticos han hecho que se produzca una importante disminución de su mortalidad. La clasificación molecular de los tumores de mama, en base a su perfil de expresión génica, ha permitido identificar grupos de pacientes con mayor riesgo de recaída. En la actualidad, los biomarcadores claves de uso clínico son el receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP), y el receptor de factor epidérmico tipo 2 (HER2), presentando valor pronóstico, predictivo y diana terapéutica. El manejo terapéutico de esta enfermedad dependerá de la clasificación del tumor en base a la determinación de estos biomarcadores, siendo quimioterapia en combinación con terapia hormonal y/o terapia anti-HER2.

Los tumores de mama HER2 positivos representan entre 20-25% de todos los tumores de mama, caracterizados por presentar amplificación del receptor HER2, siendo tumores con mayor agresividad y mal pronóstico de la enfermedad, pero con la incorporación de terapias anti-HER2 en la práctica clínica, actualmente estos tumores presentan un pronóstico favorable y un incremento de la supervivencia libre de enfermedad. La primera terapia anti-HER2 que se desarrolló fue trastuzumab, un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado con capacidad de unión selectiva al receptor HER2; posteriormente se han desarrollado otras terapias anti-HER2.

Sin embargo, existe un porcentaje alto de pacientes HER2 positivas que no responden al tratamiento con trastuzumab, principalmente debido a la presencia de otras alteraciones en el tumor no conocidas o no determinadas en el práctica clínica, que permiten evadir la acción del tratamiento con trastuzumab, promoviendo procesos de proliferación tumoral y la metástasis.

En este trabajo se han estudiados posibles mecanismos de resistencia, tanto primaria como adquirida, a la terapia con trastuzumab en modelos celulares de resistencia primaria y de resistencia adquirida generados en nuestro trabajo, además se han estudio estos mecanismos en una serie de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo.

El estudio deferencial entre líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas con resistencia primaria y sensibles a trastuzumab, han determinado que existe una ganancia de la región del cromosoma 8 (8p11.21-q22.3), que podría relacionarse con la resistencia primaria a trastuzumab. La validación esta ganancia se ha realizado mediante el estudio por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para los genes PDP1 (8q22.1) y MYC (8q24.21), demostrando que existe mayor número de copias de ambos genes en las líneas con resistencia primaria respecto a las líneas sensibles. Además, en una serie de pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo,

la ganancia de ambos genes se correlacionó de forma significativa con una menor tasa de respuestas patológicas completas.

La implicación del microambiente tumoral y las citoquinas en el desarrollo del tumor han sido ampliamente estudiadas en los últimos años. El proceso de exposición continuada a trastuzumab en modelos celulares, ha generado resistencia adquirida al fármaco, caracterizado por el incremento de expresión de varias citoquinas. De entre ellas destaca la quimioquina CCL5 cuyo papel principal en cáncer de mama es promover los procesos de proliferación y metástasis. Sin embargo la sobreexpresión de CCL5 en nuestro modelo celular ha demostrado estar implicada en la resistencia a trastuzumab. Además, en muestras de pacientes de cáncer de mama HER2 positivo, el incremento de expresión de CCL5 se correlaciona de manera significativa con una menor tasa de respuestas patológicas completas al tratamiento con trastuzumab, asociándose de forma estadísticamente significativa con menor supervivencia libre de enfermedad y menor supervivencia global en cáncer.

Summary

Breast cancer is the leading cause of death among women in Western countries. Recently, however, early detection and advances in diagnosis and therapy have led to a substantial decrease in mortality due to this disease. Molecular classification of breast tumors based on the genetic profile of tumors has made it possible to identify groups of patients at highest risk of recurrence. Currently, the key clinical biomarkers for breast cancer are estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), which have prognostic and predictive value and represent a therapy target. Management of this disease, which depends on tumor classification as determined by these biomarkers, consists of chemotherapy in combination with hormone and/or anti-HER2 therapy.

HER2+ positive tumors account for between 20% and 25% of all cases of breast cancer. These are characterized by HER2 gene overexpression, increased aggressiveness, and poor prognosis. With the introduction of anti-HER2 therapies in clinical practice, however, the prognosis of these tumors is now favorable, and disease-free survival is increasing. The first anti-HER2 therapy to be developed was trastuzumab, a humanized IgG1 monoclonal antibody that selectively targets the HER2 receptor. After the introduction of trastuzumab, other anti-HER2 therapies have followed.

However, a high percentage of patients with HER2+ tumors do not respond to therapy with trastuzumab, mostly due to the presence of other genetic alterations in the tumor that are either unknown or undetermined in clinical practice. These additional alterations may cause the tumor to be refractory to treatment with trastuzumab, promoting tumor proliferation and metastasis.

This study explores possible primary or acquired mechanisms of resistance to therapy with trastuzumab in cell models developed in our laboratory setting. Additionally, these mechanisms have been studied in a sample of patients with HER2+ breast tumors.

This study, which distinguishes between cell lines from HER2+ breast cancer with primary resistance and cells that are sensitive to trastuzumab, finds a gain in a region on chromosome 8 (8p11.21-q22.3) that may be related to primary resistance to trastuzumab. This gain has been validated through fluorescent in-situ hybridization (FISH) of the PDP1 (8q22.1) and MYC (8q24.21) genes, demonstrating that there is a greater number of copies of in both cell lines with primary resistance than in lines with sensitivity to the therapy. In addition, in a series of patients with early HER2+ breast cancer, the gain in both genes was significantly correlated with a lower rate of complete disease response.

The involvement of the tumor microenvironment and cytokines in the development of the tumor has been widely studied in recent years. The process of continued exposure to trastuzumab in cell models has led to acquired resistance to the drug characterized by increased expression of several cytokines. One such cytokine, the chemokine CLL5, is particularly noteworthy, as its primary role in breast cancer is the promotion of proliferation and metastasis. In contrast with these previous findings, our cell model shows that overexpression of CLL5 is implicated in resistance to trastuzumab. Additionally, in samples of patients with HER2+ breast cancer, increased CCL5 expression is significantly correlated with lower rates of complete response to treatment with trastuzumab, and a statistically significant association has been found with lower rates of disease-free survival and overall cancer survival.

Introducción

1. Cáncer de mama

1.1. Epidemiología

El cáncer junto con las enfermedades cardiovasculares representan las dos principales causas de muerte en los países desarrollados de acuerdo a los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Claramente el cáncer es una enfermedad de países desarrollados donde se presenta una alta incidencia y mortalidad, [1], debido fundamentalmente al incremento en la esperanza de vida y al estilo de vida. En el año 2012 se publica el informe GLOBOCAN elaborado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), organismo especializado de la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde se recogen los datos de incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer de nivel mundial y por países. La incidencia del cáncer en España en el 2012, de acuerdo a este informe, fue de 215.534 casos diagnosticados [2], la incidencia estimada para el año 2015 fue de 227.076 casos [3,4], siendo para ambos sexos, el cáncer colorrectal (15%), el cáncer con mayor incidencia, y el cáncer de pulmón (20,6%) la mayor mortalidad [2] (Figura 1).

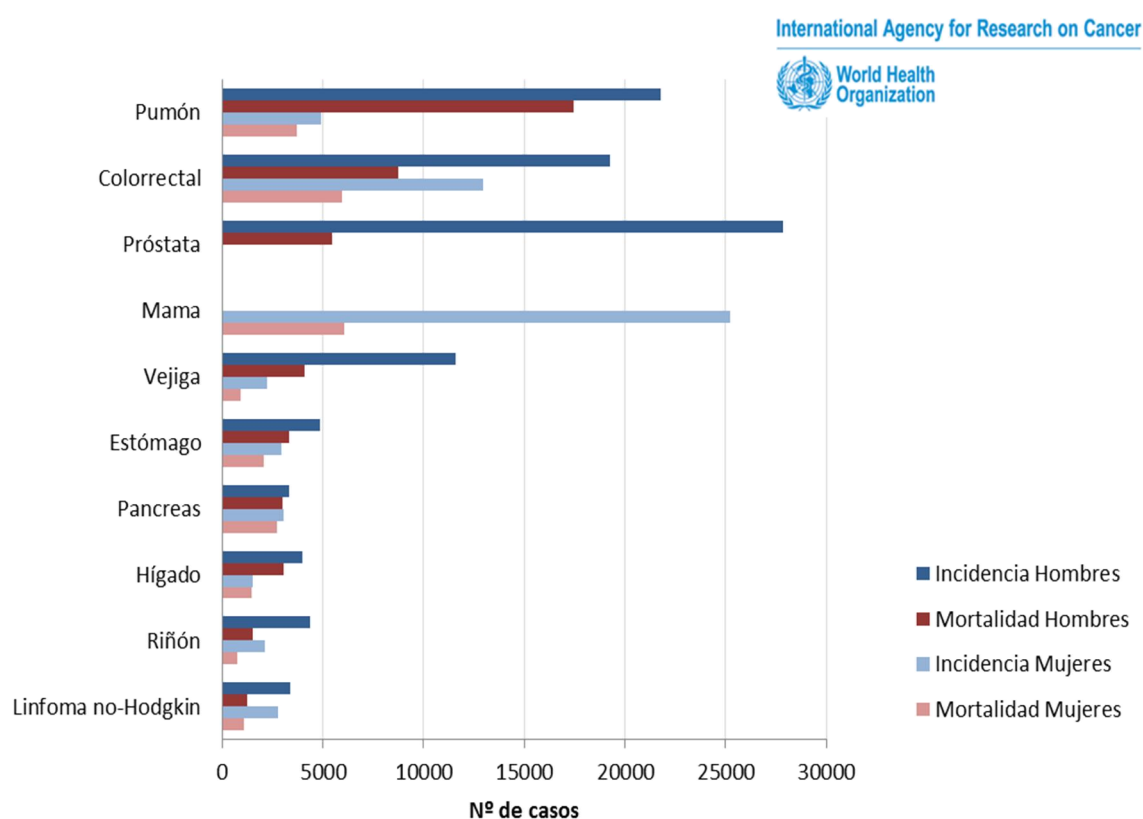


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en España separado por sexos, datos correspondientes al año 2012. Adaptado del Global Cancer Observatory de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC).

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres en países occidentales, con una incidencia en el año 2012 de 1.671.149 casos diagnosticados a nivel mundial, siendo responsable de 521.907 muertes. En España, también es la neoplasia más frecuente en mujeres, y se estima que la probabilidad de desarrollar cáncer de mama es del 8% [5]. En el año 2012 se diagnosticaron en nuestro país 25.215 casos de cáncer de mama, que representa una incidencia del 29% del total de las neoplasias en mujeres, y ocasionó 6.059 muertes, lo que representa una mortalidad del 15,5% [2]. Al igual que en otros países occidentales, la incidencia del cáncer de mama ha sufrido un considerable aumento, más marcado entre las décadas del 70 al 90 [6]. Sin embargo la detección precoz, los avances diagnósticos y terapéuticos han provocado una disminución de la mortalidad y un incremento de la supervivencia a 5 años, siendo superior al 75% [5].

1.2. Morfología del cáncer de mama como herramienta diagnóstica

El examen macroscópico y la integración de la información clínica resultan imprescindibles, en el estudio del cáncer de mama, para determinar el diagnóstico de la entidad. En la valoración macroscópica se debe incluir la descripción de la lesión, su tamaño y localización, la evaluación de los márgenes de resección en las piezas quirúrgicas, y la selección de las muestras que serán estudiadas posteriormente en el examen microscópico.

Las muestras deben ser preservadas y procesadas antes de la realización del estudio microscópico que permita el diagnóstico. De forma general, el método de preservación más común es la fijación del tejido en formol tamponado al 10%, que garantiza una óptima conservación de la morfología de los tejidos y una aceptable conservación del DNA y de las proteínas, sin embargo la conservación de la integridad del RNA es muy escasa [7,8]. El proceso de fijación es uno de los puntos más importantes de la fase pre-analítica de la muestra. Después del proceso de fijación, las muestras son incluidas en medios permanentes sólidos como parafinas o resinas plásticas. Para la valoración microscópica se realizan secciones de 3-5 μm , y se tiñen con hematoxilina-eosina. Mediante el examen microscópico se evalúan las características morfológicas de las células, su disposición y patrón de crecimiento. Se debe valorar el tamaño y las características de la cromatina y del núcleo, su relación con el citoplasma, la aparición de nucléolos, la presencia de mitosis, el patrón de crecimiento de las células y su diferenciación, y el tipo de estroma. Agrupando toda esta información, junto a la del examen macroscópico y la historia clínica, es posible emitir un diagnóstico en la patología mamaria.

En el estudio de la patología mamaria, es necesario determinar el grado histológico, realizar una correcta clasificación morfológica y determinar el estadiaje de la enfermedad en base al tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la presencia o no de metástasis.

1.3.1 Grado histológico

En la actualidad, para la determinación del grado histológico se acepta como consenso las recomendaciones recogidas en la escala de Scarff-Bloom-Richardson [9], modificada posteriormente, en 1999, por Elston y Ellis (Sistema de Nottingham) [10]. Una de las principales razones de aceptación de esta escala es su importante reproducibilidad entre observadores. Diversos estudios han demostrado la concordancia de resultados entre patólogos [11–13]. En esta escala se cuantifican tres aspectos en la diferenciación del tumor: 1) la capacidad del tumor de formar estructuras tubulares, 2) el grado de pleomorfismo o atipia en las células tumorales y 3) el número de mitosis presentes en 10 campos microscópicos.

Tabla 1. Grado histológico combinado Scarff-Bloom-Richardson, modificado por Elston y Ellis

1. Diferenciación tubular:

Score 1: > 75% del tumor forma glándulas o estructuras tubulares.

Score 2: Entre un 10 y 75% del tumor forma glándulas o estructuras tubulares.

Score 3: < 10% del tumor forma glándulas o estructuras tubulares.

2. Pleomorfismo nuclear:

Score 1: Núcleos pequeños, discretamente incrementados en volumen respecto al epitelio ductal normal; contornos regulares, cromatina uniforme, pequeña variación en los diámetros entre células.

Score 2: Células con núcleos más grandes que el epitelio ductal normal, de aspecto vesiculoso, nucléolo evidente, moderada variabilidad en forma y tamaño.

Score 3: Núcleos vesiculoso, con nucléolo prominente, con importante variabilidad en forma y tamaño; ocasionales núcleos bizarros.

3. Mitosis en 10 campos microscópicos de 400 aumentos:

Score 1: < 8 mitosis

Score 2: de 8 a 14 mitosis

Score 3: > 14 mitosis

1.3.1 Tipo morfológico

La determinación de un correcto diagnóstico morfológico debe hacerse en base a la clasificación de la OMS donde se recogen los subtipos de cáncer de mama (Tabla 2) [14]. La importancia de identificar cada uno de estos subtipos de una forma adecuada viene dada por la diferente

conducta biológica de cada uno de los subtipos.

Tabla 2. Clasificación del cáncer de mama infiltrante (OMS, 2012) (Lakhani et al. 2012)

Carcinoma microinfiltrante
Carcinoma ductal infiltrante (not otherwise specified, NOS)
Carcinoma infiltrante mixto
Carcinoma pleomórfico
Carcinoma con células gigantes tipo osteoclasto
Carcinoma con rasgos coriocarcinomatosos
Carcinoma con rasgos melanóticos
Carcinoma lobulillar infiltrante
Carcinoma tubular
Carcinoma infiltrante cribiforme
Carcinoma medular
Carcinomas mucinosos y otros tumores ricos en mucina
Carcinoma mucinoso
Cistoadenocarcinoma y carcinoma mucinoso de células columnares
Carcinoma con células en anillo de sello
Tumores neuroendocrinos
Carcinoma neuroendocrino sólido
Tumor carcinoide atípico
Carcinoma neuroendocrino de células pequeñas
Carcinoma neuroendocrino de células grande
Carcinoma papilar infiltrante
Carcinoma micropapilar infiltrante
Carcinoma apocrino
Carcinomas metaplásicos
Carcinomas metaplásicos epiteliales puros
– Carcinoma escamoso
– Adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes
– Carcinoma adenoescamoso
– Carcinoma mucoepidermoide
Carcinoma metaplásico mixto epitelial-mesenquimal
Carcinoma rico en lípidos
Carcinoma secretor
Carcinoma oncocítico
Carcinoma adenoide quístico
Carcinoma de células acinares
Carcinoma de células claras rico en glucógenos
Carcinoma sebáceo
Carcinoma inflamatorio

El carcinoma ductal infiltrante (CDI) NOS representa el subtipo más común de cáncer de mama, siendo 50%-80% de los tumores de mama invasivos, y presentan mal pronóstico, con una supervivencia a 10 años de alrededor el 50%, aunque este pronóstico se ve influenciado por el grado, el tamaño tumoral, la afectación de ganglios y la invasión vascular [14].

El carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) representa entre un 5-15% de los tumores de mama invasivos, siendo el segundo subtipo más frecuente. Entre el 80 y el 100% de los casos presenta pérdida de expresión E-cadherina, que favorece la invasividad de las células epiteliales, siendo tumores con mal pronóstico [14]

Los carcinomas de tipo tubular puro, cribiforme, mucinoso, carcinoma metaplásico con componente tipo fibromatosis y el carcinoma adenoide quístico, presentan un pronóstico excelente, con una supervivencia a los 10 años mayor del 80%, con una incidencia muy baja, no superando el 7% de los casos de cáncer de mama invasivos. También se consideran de buen pronóstico los carcinomas papilares, con una supervivencia a 10 años del 60-80%. Los carcinomas medulares, que representan el 1-7% de todos los tumores de mama invasivos, considerarse como de pronóstico intermedio [14].

Los tipos histológicos micropapilar, neuroendocrino de tipo célula pequeña 2662, el carcinoma de células claras, carcinoma inflamatorio y carcinoma rico en glucógeno muestran un peor pronóstico. Dentro de los carcinomas metaplásicos de la mama, los carcinosarcomas se comportan como tumores muy agresivos [14]

1.3.1 Estadiaje de la enfermedad

En cáncer de mama, al igual que ocurre en otros tipos tumorales, el estadiaje de la enfermedades un factor pronóstico altamente significativo, sobre todo en enfermedad precoz. Además, el manejo de la enfermedad respecto al tratamiento se ve influido en gran parte por el estadio de la enfermedad. El estadiaje viene definido por la estadificación TNM establecida por el American Joint Committe on Cancer (AJCC) [15] (Tabla 3), donde T hace referencia al tamaño tumoral, N refiere a la afectación ganglionar y M a la presencia de metástasis a distancia. El tamaño tumoral, está definido por el tamaño centímetros del tumor en su diámetro máximo, este valor se puede obtenerse mediante palpación y mamografía, o en base a los datos patológicos mediante confirmación microscópica, siendo necesario indicar la presencia de afectación de bordes quirúrgicos [14]. La afectación ganglionar se define por el número de ganglios con infiltración tumoral de la cadena axilar de la mama o a distancia, cadena ganglionar interna de la mama, ganglios infraclaviculares y supraclaviculares. Este dato difiere entre la

clasificación clínica, basada en los datos clínicos disponibles, y la clasificación patológica basada en la valoración microscópica [16]. Finalmente se evalúa la presencia de metástasis a distancia, en la gran mayoría de los casos esta evaluación se hace en base a los datos clínicos, por pruebas de imagen.

Tabla 3. Clasificación TNM en cáncer de mama

Tumor primario (T)	
T1	tumor ≤ 2 cm en su diámetro mayor
T2	tumor > 2 cm y ≤ 5 cm en su diámetro mayo
T3	tumor > 5 cm en su diámetro mayor
T4	Cualquier tamaño de tumor con extensión a pared costal o a piel (ulceración o nódulos cutáneos). Carcinoma inflamatorio.
Ganglios linfáticos regionales (N)	
N0	No metástasis en ganglios
N1	Metástasis axilar movable en los niveles I o II
N2	Metástasis fijas en niveles I y II axilares o metástasis clínicamente detectable* solo en la cadena ganglionar interna de la mama y ausencia clínica de evidencia de metástasis en ganglios regionales
N3	Metástasis en ganglios infraclaviculares (nivel III), metástasis en cadena ganglionar mamaria interna y en ganglios axilares o metástasis en cadena ganglionar supraclavicular.
Ganglios linfáticos regionales (pN)	
pN0	No metástasis histológica en ganglios
pN1	Micrometástasis o metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y/o en ganglios de cadena mamaria interna detectados mediante biopsia pero no clínicamente detectable*
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares, o en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente detectables* en ausencia de metástasis axilares.
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios axilares; o en ganglios infraclaviculares (nivel III); o en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente detectables* en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos en niveles I, II; o en más de tres ganglios axilares y ganglios de la cadena mamaria interna con micrometástasis o macrometástasis detectados mediante biopsia y sin ser clínicamente detectables; o metástasis en ganglios supraclaviculares.
Metástasis a distancia (M)	
M0	No evidencia clínica ni radiológica de metástasis a distancia.
M1	Evidencia de metástasis a distancia.
*clínicamente detectable, se define como evidencia de enfermedad en estudios de imagen o por examinación clínica y características clínicas que lo indiquen.	

De acuerdo a la clasificación TNM se obtiene al estadio de la enfermedad. En cáncer de mama se distinguen 4 estadios, considerando como enfermedad temprana los estadios I, II; enfermedad localmente avanzada los estadios IIIA y IIIB y como enfermedad avanzada y/o metastásica los estadios IIIC y IV (Tabla 4).

Tabla 4. Estadios de cáncer de mama basado en la clasificación TNM

Stage I	Stage IA	T1	N0	M0
	Stage IB	T0-T1	N1mi	M0
Stage II	Stage IIA	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
	Stage IIB	T2	N0	M0
		T2	N1	M0
		T3	N0	M0
		T3	N0	M0
Stage III	Stage IIIA	T0	N2	M0
		T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
	Stage IIIB	T3	N2	M0
		T4	N0	M0
		T4	N1	M0
		T4	N2	M0
		Any T	N3	M0
		Any T	N3	M0
Stage IV	Stage IV	Any T	Any N	M1

1.3. Marcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama

La identificación y clasificación morfológica del tumor, la determinación del grado histológico y la evaluación del estadiaje clínico, incluyendo, evaluación de estado ganglionar y la presencia o no de metástasis, son parámetros imprescindibles para el diagnóstico inicial del cáncer de mama y aportan información general asociada con el pronóstico, pero están limitados en su capacidad para predecir respuesta al tratamiento y/o riesgo de recurrencia de la enfermedad a largo plazo [17]. En las últimas décadas se han incorporado a la práctica clínica habitual la determinación de marcadores biológicos, considerados como marcadores pronósticos y/o predictivos, que permite evaluar la evolución de la enfermedad a largo plazo o seleccionar el tratamiento adecuado. Actualmente, existen 4 marcadores pronósticos y/o predictivos imprescindibles que deben ser determinados en todas las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama: Receptores de estrógenos y progesterona, receptor HER2 y el marcador de proliferación

Ki-67.

Los factores pronósticos se definen como una característica clínica o biológica del tumor que correlaciona con la supervivencia global o supervivencia libre de enfermedad, e informa de la evolución de la enfermedad, en ausencia de tratamiento. Los factores predictivos, sin embargo, se definen como una característica clínica o biológica del componente tumoral que correlaciona con la respuesta a un determinado tratamiento e informa sobre la eficacia del mismo, sin tener en cuenta la evolución clínica de la enfermedad [18].

1.3.1 Receptores de estrógenos y progesterona

Los receptores de estrógenos (RE) son proteínas nucleares que al unirse a su ligando (17- β estradiol) activan los mecanismos de transcripción que llevan a la división celular. Pertenecen a la súper familia de receptores nucleares acoplados a la proteína G, de forma general los RE [19,20]. Los receptores de progesterona (PR) forman parte de la súper familia de receptores hormonales nucleares, siendo su ligando la progesterona y cuya activación provoca la diferenciación lobulillar de mama [21].

La importancia del estudio de estos receptores, de cáncer de mama, estriba en que son considerados como el mejor marcador pronóstico y predictivo en la enfermedad [22]. Aproximadamente entre un 70-60% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama presentan positividad de RE, mientras que solo se detecta positividad de RP en un 50-60%, existe un pequeño porcentaje de casos que presentan positividad de RE y no de RP, siendo muy infrecuente la expresión de RP y la negatividad de RE [23,24]. La determinación de estos marcadores se realiza de forma rutinaria mediante técnicas de inmunohistoquímica basadas en el uso de anticuerpos extremadamente específicos y con una alta sensibilidad, de acuerdo con la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) y el Colegio Americano de Patólogos (CAP) se considera que se debe definir el caso como positivo si presenta más del 1% de células tumorales con expresión de los receptores [25].

1.3.2 Receptor HER2

El receptor HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) es un receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa.

En la década de los ochenta se observó que la sobre-expresión del receptor HER2 o la amplificación del gen, en pacientes con cáncer de mama, confería mal pronóstico y una peor supervivencia global [26]. Esta alteración se detecta en un 20-25% de los tumores de mama

otorgándoles autosuficiencia de las señales de crecimiento, mantenimiento de la angiogénesis, incremento de la proliferación celular e incremento de los mecanismos de invasión, confiriendo a estas neoplasias una mayor agresividad [27]. Todos estos factores contribuyen al incremento de la probabilidad de recidiva de la enfermedad, y probablemente en la supervivencia global.

Sin embargo, independientemente de su importancia como factor pronóstico en cáncer de mama, el receptor HER2 se considera actualmente, parte de la evaluación estándar en todas las pacientes con esta enfermedad como factor predictivo de respuesta a tratamiento [22]. Desde la década de los noventa hasta la actualidad se han desarrollado diferentes terapias específicas contra HER2.

Uno de los retos para el uso de HER2 como factor pronóstico y predictivo en cáncer de mama ha sido establecer unos métodos de valoración con suficiente reproducibilidad y que permitan discriminar el estatus del receptor de forma fiable. Las dos técnicas más comúnmente utilizadas para valorar HER2 son: 1) Inmunohistoquímica (IHQ), que mide los niveles de expresión de la proteína HER2, y 2) la hibridación in situ (ISH), generalmente con marcaje fluorescente (FISH), que detecta la amplificación del gen HER2.

La determinación de HER2 mediante inmunohistoquímica, requiere una estandarización del protocolo de realización de la técnica y de la interpretación de la tinción. Por este motivo es necesario tener en cuenta, la calidad de las muestras y la afectación de las variables pre-analíticas, el protocolo de la técnica así como los kits empleados y los algoritmos de interpretación. Todos estos parámetros fueron recogidos en el año 2007 [28] en la guía de recomendación para la determinación de HER2 elaborada por la Sociedad Americana de Oncología Médica (ASCO) y el Colegio de Americano de Patólogos (CAP), posteriormente revisada en el 2013 [29] (Figura 2). Además, en el 2009 la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) [30] publica la guía de recomendación para la determinación de HER2.

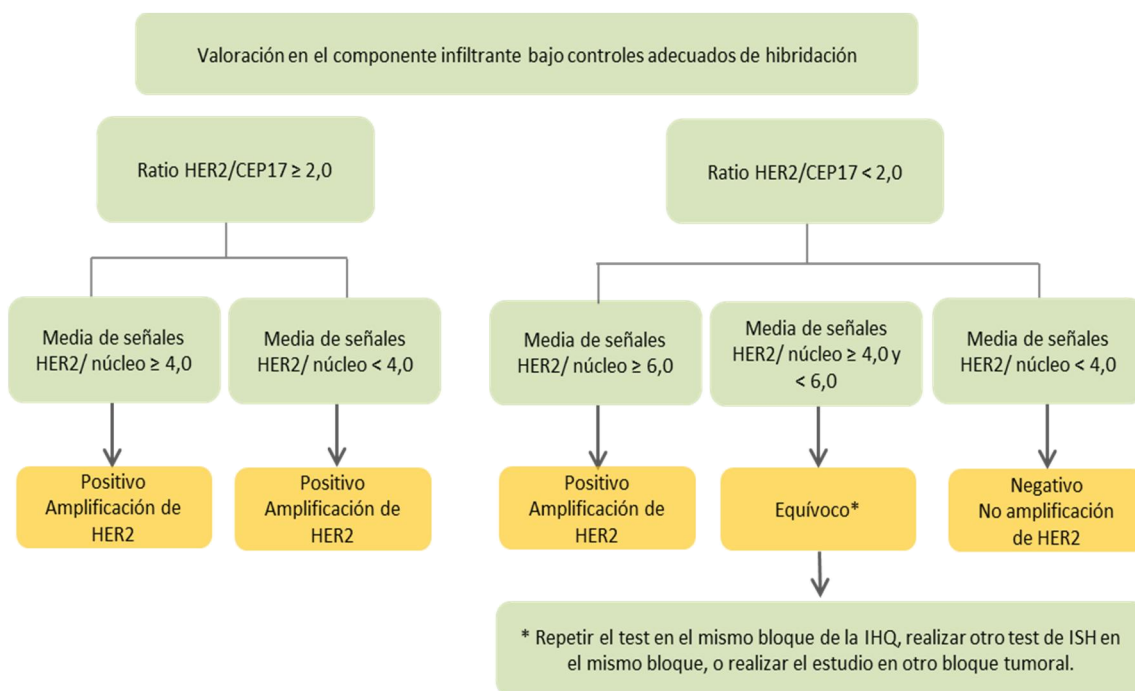


Figura 2. Algoritmo de valoración de IHQ de HER2 en muestras de cáncer de mama. Únicamente se llevará a cabo la valoración en el componente tumoral infiltrante y bajo controles positivos y negativos adecuados. Figura adaptada de la guía de recomendación para la determinación de HER2 elaborada por la Sociedad Americana de Oncología Médica y el Colegio de Americano de Patólogos del 2013 [29]

El mecanismo por el cual se produce un incremento de receptores HER2 en membrana citoplasmática, se debe a la existencia de un incremento del número de copias del gen HER2 o un incremento de la región cromosómica donde se localiza el gen, esto es lo que se denomina amplificación. Al igual que ocurre con la determinación de HER2 mediante IHQ la realización y valoración de la ISH para HER2 debe realizarse únicamente en el componente tumoral de acuerdo a lo que recogen la guía de recomendación ASCO-CAP [29] (Figura 3).

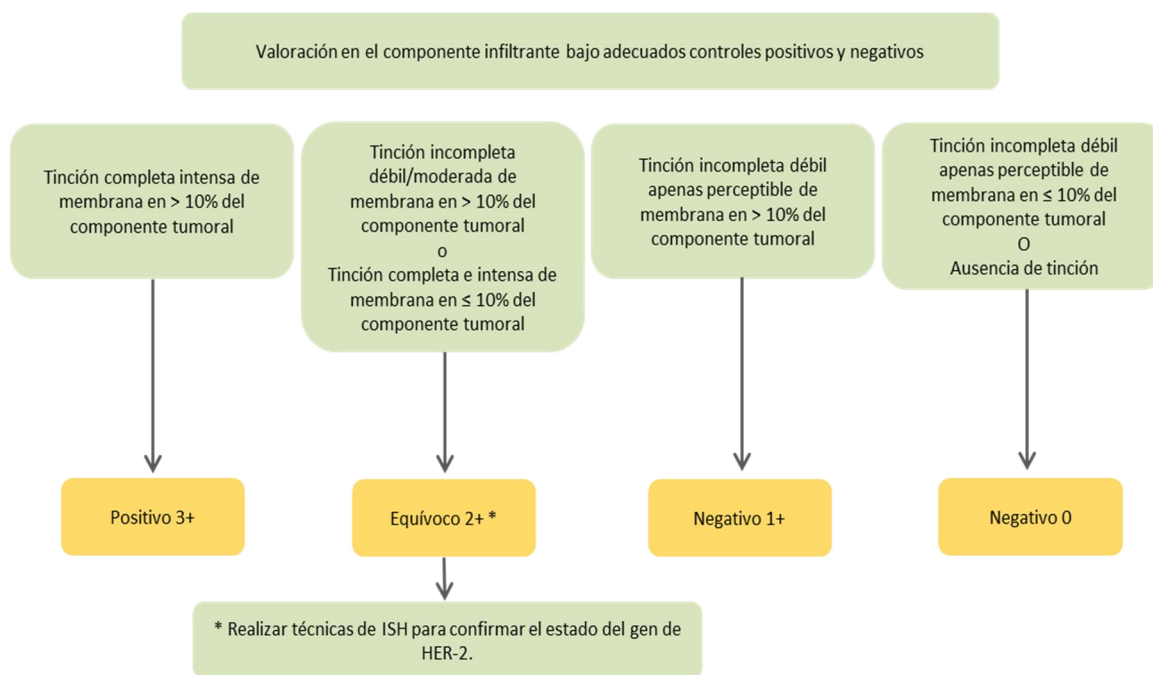


Figura 3. Algoritmo de valoración de ISH de HER2 en muestras de cáncer de mama. La valoración debe realizarse únicamente en componente tumoral infiltrante y al menos se deben evaluar 20 núcleos en los que se detecte hibridación óptima. Figura adaptada de la guía de recomendación para la determinación de HER2 elaborada por la Sociedad Americana de Oncología Médica y el Colegio de Americanos de Patólogos del 2013 [29]

1.3.3 Marcador de proliferación en cáncer de mama: Ki-67

Ki-67 es una proteína no histona que se expresa en el núcleo durante las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M), presentando niveles de expresión indetectable durante la fase G0 y alcanzando su máxima expresión en las fases G2/M, por lo que se considera como un marcador del ciclo celular e indica la tasa de proliferación [31].

Este marcador presenta valor pronóstico en cáncer de mama, de forma que si un tumor presenta una alta expresión de Ki-67, un índice de proliferación elevado, se puede asociar a una mayor agresividad. Diversos estudios han demostrado que una alta expresión de Ki-67 correlaciona con mal pronóstico, asociándose a tumores de alto grado histológico, con afectación ganglionar [32,33].

1.4. Clasificación molecular del cáncer de mama

El desarrollo y la importancia que adquirieron los marcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama, puso de manifiesto la diversidad fenotípica de esta enfermedad. Este hecho, junto con el desarrollo de la tecnología de expresión génica, evidenció que el proceso por el

cual, el epitelio mamario se transforma en una neoplasia invasora, se debe a la existencia de diferentes procesos genéticos que derivan en los diferentes tipos de cáncer mama [34,35].

El análisis de los perfiles de expresión génica permite identificar alteraciones clave en la adquisición y el mantenimiento del fenotipo tumoral. La primera descripción de la tecnología de *microarrays* para clasificar los tumores de mama fue publicada por el grupo de Perou [36] y Sorlie [37] y puso de manifiesto la existencia de diversas firmas genéticas en cáncer de mama. En los estudios iniciales se distinguieron dos subtipos molecularmente distintos, 1) tumores clínicamente RE positivos y 2) tumores, en su mayoría, RE negativos.

El subtipo de tumores RE positivos se caracterizaban por una expresión elevada de genes de las células luminales de la mama [37], y se distinguían dos perfiles moleculares distintos, luminal A, compuesto por tumores con una máxima expresión de RE, y luminal B/ luminal C, con una baja o moderada expresión de genes relacionados con la vía de activación de RE [36,37].

El subtipo de tumores RE negativos, se asociaba a la expresión de genes propios de las células basales de la unidad ducto-lobulillar. Las agrupaciones de genes expresados permitió subdividir a los tumores en tres grupos diferentes: tipo basal, tipo HER2 y un grupo denominado normal, con un perfil de expresión similar al tejido mamario normal [37].

Los estudios de perfiles de expresión génica se fueron ampliando en los años sucesivos [38,39], reforzando los subgrupos iniciales, e incluyendo un nuevo subtipo de cáncer de mama con baja expresión en Claudina [40,41].

Es evidente que esta clasificación molecular del cáncer de mama proporciona una mayor información sobre el comportamiento y evolución de la enfermedad, sin embargo, actualmente esta determinación no puede ser implantada en la rutina de los laboratorios de anatomía patológica. Por este motivo se ha establecido la correlación entre la clasificación clínica basada en IHQ y la clasificación molecular, observándose que el 76% de los tumores de mama con expresión de RE/RP y HER2 negativos, corresponden a los subtipos Luminal A y Luminal B, y que el 71% de los tumores de mama HER2 positivos corresponden al subtipo HER2, sin embargo, existe un 18% de estos tumores, que molecularmente se clasifican como subtipo basal [42,43] (Figura 4).

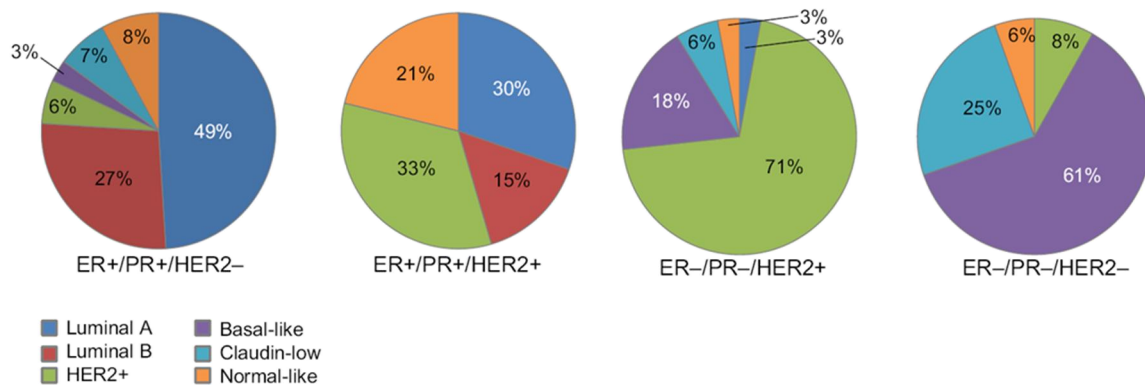


Figura 4. Correlación entre la clasificación inmunohistoquímica y la clasificación molecular de tumores de mama (Rivenbark, O'Connor, and Coleman 2013)

1.5. Perfiles moleculares en cáncer de mama: Valor pronóstico y predictivo

El conocimiento de la existencia de distintos patrones moleculares en cáncer de mama, mediante la utilización de microarrays de ADN, ha permitido que se establezcan correlaciones pronósticas y predictivas de firmas genómicas que permiten identificar grupos de tumores con comportamiento más agresivo o peor respuesta a un tratamiento [18,44,45].

El laboratorio del Netherlands Cancer Institute [46], liderado por van Ver, ha identificado una firma genética de 70 genes que permite segregar grupos de pacientes con buen y mal pronóstico, así como perfiles de expresión característicos para los tumores con expresión de ER, sin ER. Esta firma incluía genes implicados en el control del ciclo celular, la invasión, la metástasis, la angiogénesis y la transducción de señales. Esta plataforma se ha comercializado como el test MammaPrint® (Agendia) como un ensayo pronóstico puro para las mujeres de menos de 61 años con tumores menores de 5 cm, con o sin expresión de receptores de estrógenos, y ganglios linfáticos negativos. Este perfil ha sido validado en una serie de 295 pacientes con cáncer de mama estadio I-II, revelando una capacidad de predicción superior a las clasificaciones basadas en criterios clínicos, además estos resultados son independientes de la edad, del grado histológico o del número de ganglios positivos [46].

Además de como factores pronósticos, los perfiles de expresión génica pueden tener un papel como marcadores predictivos de respuesta a determinadas terapias. Un modelo de esta aplicabilidad predictiva es el test OncotypeDX® (Genomic Health), que predice el beneficio o no del tratamiento adyuvante con tamoxifeno a pacientes con cáncer de mama, ganglios axilares negativos y con expresión de receptores de estrógenos [47,48]. Esta firma genética se basa en la expresión por RT-PCR de 21 genes, que incluye 16 genes asociados a cáncer y 5 genes de referencia o endógenos, invariables en cáncer de mama [48].

Sobre la expresión de estos 21 genes se calculó el riesgo de recurrencia (RS) utilizando un algoritmo basado en la relación ponderada de los niveles de expresión de los grupos de genes, resultado tres grupos de pacientes con comportamiento clínico, alto riesgo de recurrencia, bajo riesgo de recurrencia y un grupo intermedio [48–50]. Este algoritmo de expresión se validó con 675 muestras procedentes del ensayo clínico multicéntrico NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) B-14, que incluía a 2.167 pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama con expresión de estrógenos y ganglios negativos, y aleatorizadas a tratamiento con tamoxifeno o placebo [51].

Otra plataforma basada perfiles de expresión génica es el ensayo PAM50, Prosigna (NanoString Technologies) que identifica la expresión de 50 genes predictivos en cáncer de mama mediante qPCR. Este ensayo permite estratificar a los pacientes en tres categorías de riesgo: alto, bajo e intermedio y proporciona, además, el subtipo tumoral intrínseco (Luminal A, Luminal B, HER2 *enriched* o *basal-like* [52,53]. Este ensayo, junto con MammaPrint ha sido autorizado por la FDA y ha sido validado en 2 grandes estudios que incluyen más de 2400 pacientes (TransATAC y ABCSG-8)[54] .

1.6. Tratamiento del cáncer de mama

Junto con los avances en la detección precoz, la correcta selección del tratamiento ha posibilitado la disminución de la mortalidad por esta neoplasia en las últimas décadas. El tratamiento del cáncer de mama ha evolucionado considerablemente en los últimos años gracias a la incorporación en la práctica clínica habitual de los 4 marcadores biológicos definidos anteriormente, RE, RP y HER2, y al desarrollo de terapias dirigidas frente a estas moléculas. La selección terapéutica de los pacientes con cáncer de mama se realiza en comités multidisciplinares, en los que se integra toda la información clínica y patológica del paciente. En España, habitualmente se siguen las recomendaciones recogidas en las guías elaboradas por el National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [55].

El manejo terapéutico de la enfermedad va a depender, en primera instancia, del estadio tumoral; en enfermedad temprana y localmente avanzada (estadios I, IIA, IIB, IIIA) el fin último del tratamiento es curativo, realizando tratamiento local con cirugía y tratamiento sistémico, mientras que en enfermedad metastásica (estadios IIIC y IV) el tratamiento es paliativo, centrado en prolongar la supervivencia de las pacientes con la máxima calidad de vida [56,57]. Sin embargo la selección de la terapia sistémica en la actualidad depende del subtipo tumoral definido por RE, RP y HER2, y es independiente del estadio tumoral.

La terapia principal en estadios iniciales es la cirugía, en los últimos años la tendencia general es la realización de una cirugía conservadora, principalmente tumorectomía evitando la realización de mastectomía radical [55,58,59] y restringiendo los vaciamientos axilares debido a su alta morbilidad [16]. La cirugía puede ir acompañada de radioterapia en casos en los que existe proximidad del tumor con los márgenes de resección, diversos estudios han revelado que este tratamiento reduce el riesgo de recidiva en un 10-20% [58,60,61]. Tras la cirugía y/o radioterapia, las pacientes reciben tratamiento sistémico, denominado terapia adyuvante, cuya finalidad principal es reducir el riesgo de recidiva de la enfermedad. El tratamiento seleccionado habitualmente consiste en quimioterapia en combinación con terapia hormonal o terapia anti-HER2. Sin embargo en determinadas circunstancias, como en tamaños tumorales T2 y T3 se realiza tratamiento previo a la cirugía denominado terapia neoadyuvante. Esta terapia tiene como objetivo la reducción del tumor en respuesta a la quimioterapia, posibilitando la realización de una cirugía en tumores inoperables estadio IIIC, y cirugía más conservadora en tumores operable. Además, esta terapia permite evaluar la respuesta al tratamiento mediante la valoración de respuesta patológica completa (qPCR), factor pronóstico de la supervivencia libre de enfermedad [62,63].

1.6.1 Quimioterapia

La quimioterapia es el tratamiento más empleado en cáncer. Los diferentes antineoplásicos se clasifican en función de su mecanismo de acción, en cáncer de mama los más empleados son las antraciclinas (doxorrubicina y epirrubicina) cuyo mecanismo de acción principal es la inhibición de la topoisomerasa II e induciendo muerte celular [64,65]; y los taxanos (docetaxel y paclitaxel) con capacidad de unión a los microtúbulos impidiendo la división celular y la proliferación [66].

La quimioterapia en cáncer de mama temprano o localmente avanzado puede ser administrada en esquema de neoadyuvancia o en esquema de adyuvancia, varios estudios han demostrado que no existen diferencias entre ambos esquemas en progresión libre de enfermedad ni en supervivencia global [67,68]. Sin embargo, tras el desarrollo de microarrays de expresión génica y el descubrimiento de los distintos patrones moleculares en cáncer, distintos estudios pusieron de manifiesto que existen subtipos tumorales que no se benefician del tratamiento con quimioterapia [69,70].

1.6.2 Terapia en tumores RE y RP positivos

Actualmente la terapia hormonal es la terapia de elección para el tratamiento de los tumores mama RE y/o RP positivos (luminales A y B). En cáncer de mama en estadios iniciales este

tratamientos se administra en adyuvancia, tras la cirugía y se prolonga hasta 5-10 años [55,56]. Esta terapia ha demostrado que reduce el riesgo de recaída de la enfermedad, tanto en mujeres pre-menopáusicas como post-menopáusicas [71].

Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la actividad celular mediada por los RE y RP. Existen dos grandes grupos de fármacos:

- 1) Moduladores selectivos de RE, denominados SERMs, cuyo mecanismo de acción es el bloque selectivo del receptor impidiendo su activación. El fármaco de esta clase mayormente empleado en pacientes pre-menopáusicas es el tamoxifeno [72–74][75].
- 2) Inhibidores de aromataza, denominados AIs, que provocan la inhibición de la aromataza, responsable de la transformación de andrógenos en estrógenos, reduciendo así la formación de estrógenos. Dentro de este grupo el fármaco mayormente empleado es letrozol [75–77].

Además, en los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos que han demostrado importantes beneficios en este tipo de tumores en combinación con la terapia hormonal.

El primer fármaco aprobado fue everolimus (Afinitor, Novartis), derivado de la rapamicina con capacidad de bloquear el complejo mTORC1, que disminuye los efectos de proliferación celular mediados por la ruta PI3K/AKT/mTOR e inhibe la proliferación linfocitaria mediada por citoquinas. En el ensayo BOLERO-2 se evaluó la adición de everolimus al tratamiento con inhibidores de aromataza en pacientes con cáncer de mama metastásico RE positivo. En base a los resultados de este ensayo la FDA aprobó el tratamiento con everolimus, en julio del 2012, en pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama avanzado RE positivo, HER2 negativo [78].

Posteriormente se desarrolló palbociclib (Ibrance®, Pfizer), un potente inhibidor específico de CDK4/6 con una importante acción antitumoral que ha demostrado disminución de la proliferación celular en líneas celulares, inhibiendo angiogénesis, e inhibición de ciclooxigenasa II (COX-II) disminuyendo la transición epitelio mesénquima (EMT). La FDA, en febrero de 2015, aprobó el tratamiento con palbociclib en combinación con letrozol para el tratamiento de mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama avanzado RE positivos y HER2 negativo en base a los resultados obtenidos del ensayo PALOMA-3. Además, en febrero del 2016, gracias al ensayo PALOMA-1/TRIO-18, se aprobó el empleo de este fármaco en combinación con fulvestrant para el tratamiento de cáncer de mama avanzado o metastásico RE positivo, HER2 negativos, con progresión a la terapia hormonal [79–81].

1.6.3 Terapia en tumores HER2 positivos

La terapia anti-HER2, es en la actualidad, el tratamiento de elección para aquellas pacientes con tumores de mama con amplificación de HER2, tanto en estadios iniciales como en enfermedad metastásica.

Desde la década de los noventa hasta la actualidad se han desarrollado diferentes terapias específicas contra HER2. En el año 1995 la empresa Genentech desarrolla la primera terapia anti HER2, trastuzumab (Herceptin®), un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado con capacidad de unión selectiva al receptor HER2, en su dominio extracelular [82]. Este fármaco demostró tener un efecto anti-tumoral, inicialmente en líneas células, y posteriormente en tumores que presentaban sobreexpresión de HER2. En el año 2001, se realizó el análisis final de un estudio pivotal en fase III, desarrollado en pacientes afectas de cáncer de mama metastásico con sobreexpresión HER2 determinada mediante inmunohistoquímica (IHQ) demostrándose que la asociación de trastuzumab a la quimioterapia comportaba un beneficio significativo en el tiempo a la progresión en comparación con el grupo de quimioterapia en monoterapia [83]. Estos hallazgos fueron apoyados por otros estudios fase III (NSABP B31, N9831 y HERA) [84–86]. En el año 1998, la FDA aprobó el tratamiento con trastuzumab en combinación con dos esquemas de quimioterapia para pacientes con cáncer de mama metastásico, siendo la obligatoria la determinación del estatus HER2 como variable predictiva en cáncer de mama para la selección de terapia anti-HER2.

Posteriormente, la empresa farmacéutica Glaxo Smith Kline, desarrolló un nuevo fármaco, Lapatinib (Tykerb®), una molécula pequeña capaz atravesar la membrana citoplasmática y actuar como inhibidor de la actividad tirosina-quinasa del receptor HER2 [82]. Este fármaco fue aprobado en 2007 por la FDA como tratamiento en combinación con capecitabina en pacientes con cáncer de mama metastásico que habían progresado al tratamiento en primera línea con trastuzumab. Los ensayos fase III demostraron que la combinación de lapatinib con capecitabina incrementaba el tiempo a la progresión en las pacientes, 27.1 semanas vs 18.6 semanas en el grupo de capecitabina en monoterapia [87].

Actualmente, en la práctica clínica, la primera línea de elección en pacientes de cáncer de mama con sobre-expresión de HER2 es la combinación de trastuzumab y quimioterapia, hasta recaída de la enfermedad o toxicidad. En los casos de progresión se aconseja continuar con tratamiento anti HER2, bien sea lapatinib o trastuzumab en combinación con otros agentes quimioterápicos.

Sin embargo, debido a la aparición de resistencias a trastuzumab, se han desarrollado nuevas estrategias de tratamiento, centrándose en la terapia combinada, originando el desarrollo de nuevos fármacos anti HER2 como pertuzumab (Perjeta®) y TDM-1 (Kadcyla®) de la empresa Genentech.

Pertuzumab (Perjeta®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que impide la formación de heterodímeros con HER2, fundamentalmente la dimerización de HER2 con HER-3, que se emplea de forma dual con trastuzumab potenciando su efecto. En base a los resultados del ensayo fase III CLEOPATRA, se ha aprobado el empleo de pertuzumab en combinación con trastuzumab y taxanos en enfermedad metastásica HER2 positiva [88].

TDM-1 (Kadcyla®) que combina el anticuerpo trastuzumab unido mediante enlace covalente a una molécula de un agente citotóxico, DM-1. Las primeras conclusiones del estudio fase III EMILIA en el que se evalúa la acción de TDM-1 frente al tratamiento con lapatinib mas capecitabina en pacientes con cáncer de mama metastásicos HER2 positivas previamente tratadas con trastuzumab y taxanos, indican que el tratamiento con TDM-1 otorga un beneficio de 3.2 meses en el tiempo a la progresión frente al tratamiento de lapatinib mas capecitabina [89].

De acuerdo a las terapias existentes descritas, a continuación se muestra el algoritmo de selección de tratamiento en cáncer de mama de acuerdo función del subtipo tumoral, independientemente del estadio de la enfermedad (Figura 5):

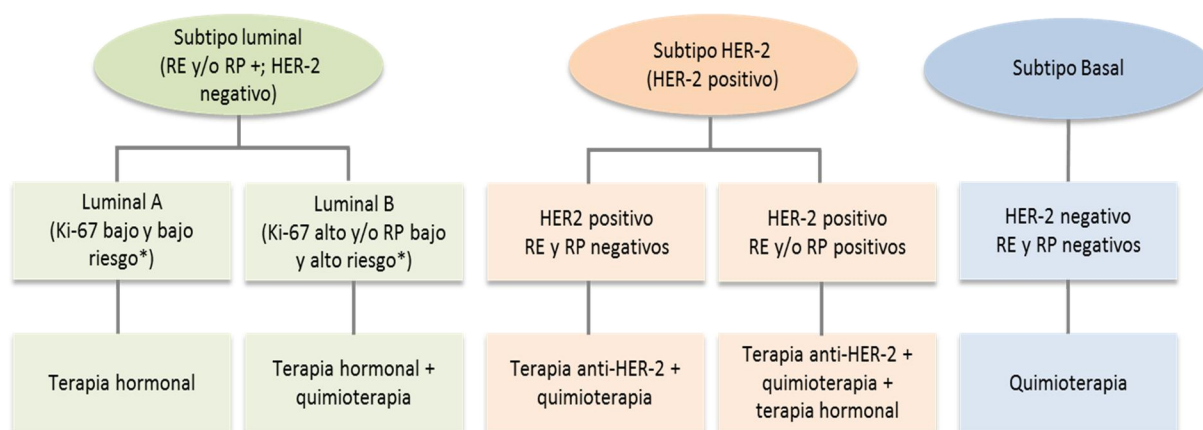


Figura 5. Algoritmo de decisión de estrategias terapéuticas de acuerdo los distintos subtipos biológicos de cáncer de mama, recomendación de las guías elaboradas por el *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN). Imagen adaptada de Harbeck N, Gnant M; Lancet, 2016 [56].

*Riesgo de recurrencia de la enfermedad determinado por plataformas genómicas, como OncotypeDX DX o PAM50.

1.7. Alteraciones moleculares en cáncer de mama

1.7.1 TP53

El gen p53 es un gen supresor de tumores implicado en multitud de procesos celulares, como control de la transcripción, o reparación de DNA, que presenta de forma frecuente alteraciones genéticas. La inactivación de TP53 debido a mutaciones ocasiona arresto celular y disminución de apoptosis, así como procesos de resistencia a agentes que inducen daño en el DNA. Aproximadamente un 50% de los tumores presenta alteraciones en este gen, concretamente en cáncer de mama se han descrito alteraciones en TP53 asociándose a un peor pronóstico de la enfermedad [90]. Además, también se asocia a una peor respuesta a la quimioterapia y al tratamiento con terapia hormonal [91]. Los tumores de mama que presentan mutaciones en el gen TP53 presentan grados histológicos elevados, así como altos índices de proliferación, y negatividad para RE y positividad de HER2 [92].

1.7.2 Alteración del ciclo celular

El control del ciclo celular se encuentra regulado por multitud de proteínas activadores e inhibidores, entre las cuales destacan las ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) que provocan el paso de la fase G1 a la fase S ayudadas por las ciclinas D. La alteración de estas proteínas implicadas en control del ciclo celular se han descrito de forma frecuente en cáncer de mama.

Numerosos estudios han descrito asociaciones entre la expresión anómala de proteínas implicadas en el control del ciclo celular, como ciclina D, ciclina E, p27, p21, MYC y el comportamiento biológico del tumor en el cáncer de mama [93]. Concretamente la disminución de los niveles de expresión de ciclina E se asociaron a una mejor supervivencia en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo [94], así como su amplificación o sobreexpresión se ha descrito como un posible mecanismo de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo [95]. Además, la pérdida o disminución de la actividad de p21 se ha relacionado con un incremento de la transición de fase G1 a la fase S y se ha asociado con una peor respuesta a tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama subtipo luminal [96]. La pérdida de p21, puede ser debida en parte a la amplificación de ciclina E y del oncogén c-MYC [97].

MYC es una proteína multifuncional, codificada por el gen c-Myc localizado en el cromosoma 8 (8q 24.21), que actúa como factor de transcripción promoviendo ciclo celular e induciendo apoptosis en respuesta a estrés celular. Una importante proporción de tumores sólidos

presentan alteraciones en este gen, se han descrito traslocaciones y amplificaciones [98,99]. Concretamente en cáncer de mama, se ha descrito que, aproximadamente un 15% de los tumores de mama presentan amplificación del gen MYC, y en más de un 40% se detecta sobreexpresión de la proteína [100]. Esta amplificación se ha correlacionado con los distintos subtipos de cáncer de mama, asociándose a fenotipo basal, y siendo menos frecuente en tumores HER2 positivos y luminales. Además, se ha descrito una asociación entre los tumores de cáncer de mama BRCA1 mutados con la amplificación de MYC [101]. La amplificación de MYC se ha descrito fundamentalmente, en tumores infiltrante de alto grado, pero existe un porcentaje de amplificaciones detectadas en tumores in situ [101,102], además, recientemente, se han descrito amplificaciones del gen en el tejido adyacente al tumor infiltrante, indicando que MYC puede estar implicado en procesos de relación del tumor como el microambiente tumoral [103].

La expresión de MYC se encuentra altamente regulada por los diferentes efectores de las rutas de señalización celular más importantes, incluyendo RAS/MAPKs, PI3K/AKT/mTOR, Wnt y NF- κ B. La desregulación de MYC se asocia al desarrollo y progresión en cáncer de mama y provoca un incremento de la proliferación y diferenciación celular [101,102]. La implicación más aceptada de la amplificación de MYC es su asociación con un peor pronóstico de la enfermedad y un mayor índice de metástasis.

1.7.3 Microambiente tumoral: quimioquinas

Uno de las principales incorporaciones que realizaron Hanahan y Weinberg en su revisión del 2011 [104] con respecto a su trabajo publicado en el año 2000, fue considerar que un tumor no puede ser comprendido como una entidad independiente sino que se debe considerar en el contexto del microambiente tumoral, se debe considerar como una entidad que engloba un conjunto de alteraciones, con un origen heterogéneo en continua interacción con el estroma, células no tumorales y el sistema inmune.

En 1863 Rudolf Virchow evidenció la presencia de linfocitos en el tejido tumoral e indicaba que existía una conexión entre la evolución del tumor y la inflamación. En la actualidad esto es un hecho constatado, en diferentes tipos tumorales se ha demostrado que la inflamación es un cofactor en la carcinogénesis. El desarrollo y la progresión tumoral está altamente modulado por el microambiente tumoral [105,106].

La interacción del tumor con el microambiente esta medida, fundamentalmente, por la superfamilia de proteínas denominadas citoquinas, proteínas solubles de bajo peso molecular,

producidas y secretadas por multitud de células cuya principal función es la regulación de la respuesta inmune, pero que también participan en procesos de proliferación y diferenciación celular.

Tabla 5. Clasificación de la superfamilia de citoquinas

	Descripción	Miembros más relevantes
Interleucinas	Implicadas en respuesta inmunitaria innata y adquirida Favorecen el crecimiento leucocitario Existen hasta 33 tipos de interleucinas, algunas formas con función pro-inflamatorias y otras con función inmunosupresora	IL-1 e IL-6: pro-inflamatoria IL-5: Proliferación y diferenciación de eosinófilos IL-10, IL-19, IL-20 e IL-22: Inmunosupresoras IL-18 e IL-23: citotóxicas
Interferones	Activan células del sistema inmune, principalmente macrófagos y natural killer Su producción suele estar inducida por interleucinas y otras citoquinas	Tipo I: $\text{INF}\alpha$ / $\text{INF}\beta$. Efecto antiproliferativo e inmunomodulador. Actividad antitumoral Tipo II: $\text{INF}\gamma$. Activa a macrófagos. Incrementando la expresión de MHC 1 y 2 y la presentación antigénica Tipo III: $\text{INF}\lambda$ Recientemente descubiertos sus funciones aún no están claras
Factores de crecimiento	Implicados proliferación y diferenciación celular	$\text{TGF}\beta$: Acción antiinflamatoria; EGF: ligando del receptor EGFR
Factores de necrosis tumoral	Principales mediadores de la respuesta inflamatoria aguda	$\text{TNF}\alpha$: Pro inflamatorias. Actividad citotóxica. Induce la expresión de moléculas de adhesión. $\text{TNF}\beta$: Pro inflamatorias. Induce cambios en la permeabilidad y moléculas de adhesión. Es inhibida por IL-10.
Quimioquinas	Quimiotaxis/Pro inflamación. Quimioatrayentes de células del sistema inmune. Acción pro-antigénica	Subfamilia CXC: Quimioatrayente de neutrófilos y linfocitos Subfamilia CC: Quimioatrayente monocitos, células dendríticas y macrófagos

Concretamente, las quimioquinas son una importante familia de citoquinas caracterizadas por ser quimioatrayentes de células del sistema inmune. Se clasifican en 4 sub-familias en función de la disposición de los residuos de cisteína; las sub-familias CXC (α -quimioquinas), CC (β -quimioquinas) y CX3C (δ -quimioquinas) que presentan 4 cisteínas altamente conservadas; y la

sub-familia C, que únicamente presenta 2 cisteínas. Las sub-familias CXC y CX3C se distinguen por la presencia de un único aminoácido entre las dos primeras cisteínas, en el caso CXC; o de tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas, en la sub-familia CX3C; mientras que el grupo CC presentan las dos primeras cisteínas adyacentes. Los miembros de las sub-familias CXC y CC son los mayormente conocidos y se han descrito hasta 40 miembros. Las quimioquinas CXC son quimioatrayentes de neutrófilos y linfocitos mientras que el grupo CC son quimioatrayentes de monocitos, células dendríticas y macrófagos [107]. Todas las quimioquinas actúan vía receptores de membrana tipo proteínas G (GPCR) con 7 dominios transmembrana, que promueven la activación de diferentes vías de señalización celular que favorecen la quimiotaxis y la proliferación. Varias quimioquinas tienen una alta capacidad de unión con varios receptores, al igual que varios receptores tienen una alta afinidad por diferentes ligandos [108].

La implicación de las quimioquinas en diferentes tipos de cáncer ha sido ampliamente discutida en los últimos años. Se ha demostrado que tanto las quimioquinas como sus receptores son producidos y expresados por las células tumorales.

La quimioquina CCL5, también conocida como RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), perteneciente a la subfamilia de quimioquinas CC o β -quimioquinas. El gen que codifica para esta β -quimioquinas se localiza en el cromosoma 17 (17q11.2-q12) dando lugar a una proteína de 8 kDa. Es expresada por células endoteliales, plaquetas, y células del sistema inmune, estando implicada principalmente en la atracción de macrófagos, linfocitos T, y en menor medida de otras células del sistema inmune. Inicialmente se identificó que CCL5 presenta afinidad por los receptores CCR1, CCR3 y CCR5, siendo con CCR5 con la mayor afinidad presenta, posteriormente se ha descubierto que también tiene capacidad de unión con CCR4 y GPR75, y de forma poco frecuente con los receptores atípicos de quimioquinas ACKR1, ACKR2 y CCRL12. La señal intracelular mediada por CCL5 depende del receptor con el que interactúe. Además, el receptor CCR5 no es exclusivo de CCL5, teniendo la capacidad de interactuar con otras quimioquinas de la subfamilia CC [109,110].

Al igual que ocurre con otras quimioquinas, CCL5 puede ser sintetizada y secretada por las propias células tumorales, mediando el reclutamiento de macrófagos acompañantes de tumor, o desencadenando procesos intracelulares en la célula tumoral [109]. La inducción de la expresión de CCL5, en cáncer de mama, está mediada por la activación de la proteína activadora 1 (AP-1), en combinación con el factor de transcripción c-jun, que son activados por las rutas de señalización celular PI3K/AKT/mTOR y RAS/MAPKs, concretamente vía JNK. La regulación de su síntesis, se especula que se realiza mediante un proceso de retroalimentación

positiva, CCL5 se une al receptor CCR5, activándolo mediante fosforilación y activando a las dos vías de señalización implicadas en su síntesis [111,112].

En los últimos años la implicación de CCL5/CCR5 en procesos de proliferación y metástasis, ha cobrado relevancia en cáncer de mama por la posibilidad de poder actuar como una diana terapéutica. El receptor CCR5 media la entrada del virus de la inmunodeficiencia-1 (VIH) en los linfocitos T CD4⁺. Durante la fase de acoplamiento y unión al receptor, el virus VIH, mediante su glicoproteína de superficie gp120 se une al receptor CD4 presente en linfocitos T y en otras células del sistema inmune, y a los correceptores CCR5 y CXCR4. Se han desarrollado potentes inhibidores antagonistas que impiden la unión del virus al correceptor CCR5, impidiendo la entrada del virus en el linfocito T. El primer fármaco desarrollado fue maraviroc (MVC, Selzentry®, UK-427,85) desarrollado por Pfizer que fue aprobado por la FDA en el año 2007 para el tratamiento de pacientes con VIH [113,114].

El uso de este fármaco en cáncer de mama, podría impedir la activación del receptor CCR5 mediada por la acción autocrina de CCL5. Estudios preliminares en líneas celulares y modelos murinos han demostrado que maraviroc impide la unión de CCL5 a CCR5 disminuyendo la proliferación y el desarrollo de metástasis [115].

2. Cáncer de mama HER2 positivo

Como se ha indicado en apartados anteriores, los tumores de mama HER2 positivos se caracterizan por presentar amplificación del gen HER2, y representan 20-25% de todos los tumores de mama.

2.1 Señalización celular mediada por receptor HER2

El gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (human epidermal growth factor receptor 2, HER2, HER2/neu, c-erbB-2) [116] se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q12-21.2) y codifica para un receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa. Está constituida por tres dominios, un dominio extracelular (ECD) correspondiente al N-terminal de 110 kDa (p110) rico en cisteínas, un dominio transmembrana y un dominio intracelular C-terminal de 95kDa (p95) que presenta actividad tirosina-quinasa.

Este receptor pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor receptor family, ErbB, HER), constituida por cuatro integrantes, HER1 o EGFR, HER2, HER3 y HER4 (Figura 6).

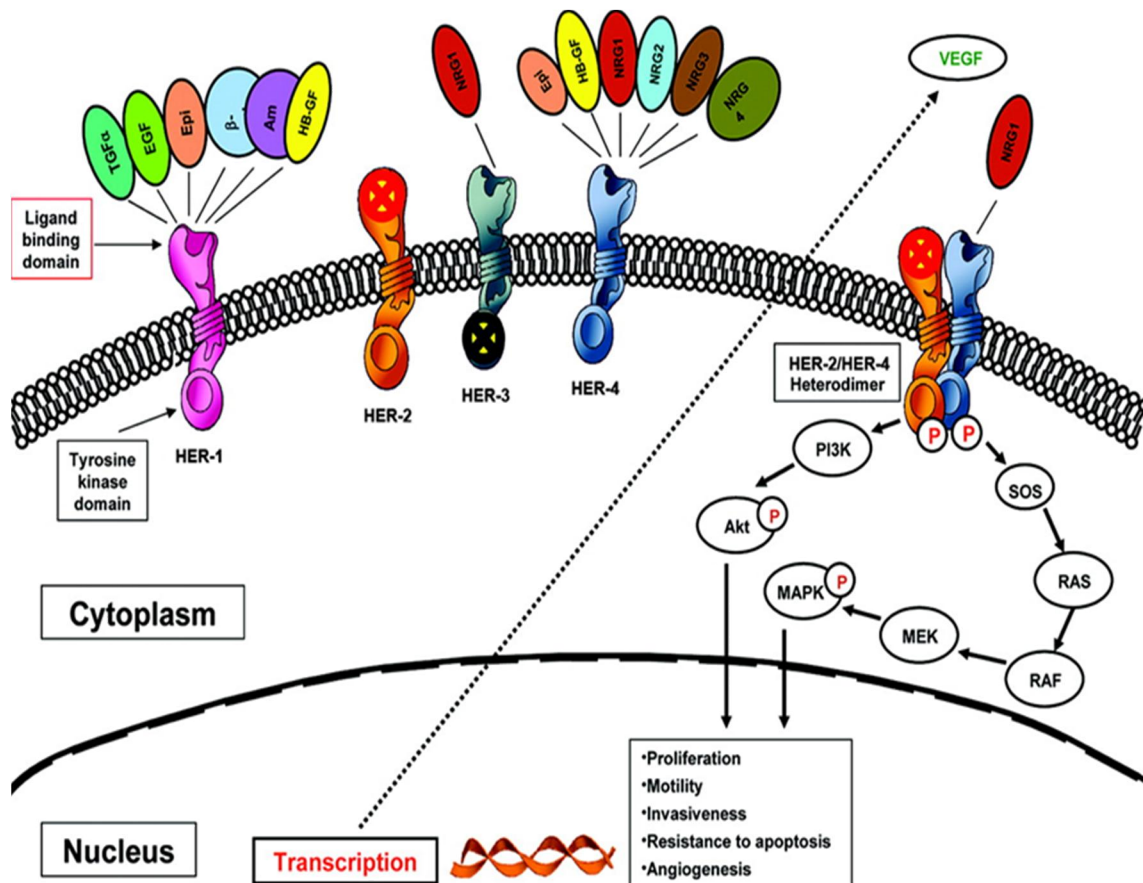


Figura 6. Familia de receptores de crecimiento epidérmico. La activación y dimerización de los distintos miembros de la familia HER se produce por la unión de los diferentes ligandos implicados. HER2 no presenta ligandos conocidos, y HER3 no presenta dominio de activación tirosina-quinasa. La dimerización de los diferentes miembros de la familia provoca la activación de rutas de señalización celular Adaptado de Ross JS et al, 2009, Oncologist [26].

La activación de los receptores de la familia HER precisa la unión con diferentes ligandos. HER-1 o EGFR presenta numerosos ligandos entre los que se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), epiregulina (EPG), TGF α , amfiiregulina (AR), heparina de unión-EGF (HB-EGF); HER-3 presenta como ligandos a neuregulina-1 y neuregulina-2 (NRG-1 y NRG-2), mientras que neuregulina-3 y neuregulina-4 (NRG-3, NRG-4) son ligandos del receptor HER-4. Hasta el momento no se han descrito ligandos para el receptor HER2. Tras la unión del ligando correspondiente se produce la homo o heterodimerización de los miembros de la familia HER, siendo HER2 el compañero de dimerización preferido de los otros miembros de la familia, constituyendo heterodímeros más estables que los homodímeros y una transducción de señales más potente. El heterodímero más estable es HER2/HER-3, seguido del heterodímero HER2/HER-1. La formación de estos homodímeros o heterodímeros, tras la unión del ligando, provoca la

fosforilación del dominio tirosina-quinasa intracitoplasmático de los receptores y la activación en cascada de las diferentes rutas de señalización implicadas [26].

La amplificación de HER2 provoca el incremento de la activación de dos importantes rutas de señalización celular implicadas en procesos de regulación celular, controlando procesos de proliferación, movilidad, invasión, resistencia a apoptosis y angiogénesis.

La ruta RAS/MAPKs es una importante ruta de señalización celular que promueve la proliferación celular y supervivencia. La formación de heterodímeros de HER2 con otro miembro de la familia HER, provoca la activación de esta ruta cuyos efectores finales se trasladan al núcleo donde tienen la capacidad de activar a distintos factores de transcripción [117].

Esta ruta de señalización está implicada en procesos de supervivencia celular, y metástasis. Su principal efector de la ruta es la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), proteína lipídica que es activada por receptores tirosina quinasa (RTKs) como los miembros de la familia HER o la familia de receptores de insulina (IGFs) [118].

2.1 Mecanismos de acción de la terapia anti-HER2

El principal mecanismo de acción de la terapia anti-HER2, es el bloqueo de la activación de ambas rutas de señalización, disminuyendo considerablemente los fenómenos celulares provocados por estas dos vías.

El efecto antitumoral demostrado de trastuzumab se debe, fundamentalmente, a tres mecanismos de acción: 1) a nivel molecular produce la infraregulación de la expresión de HER2, bloqueando la formación de heterodímeros e inhibiendo las rutas de señalización celular mediadas por su activación [119]; 2) interacción de trastuzumab con el HER2 provoca el incremento de los niveles de p27^{kip1} que provoca arresto en fase G1, y reducción de la proliferación celular [119]; y 3) induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en la que intervienen células natural killer (NK), neutrófilos y macrófagos [120].

2.3 Resistencia a trastuzumab

La incorporación de la terapia anti-HER2 en la práctica clínica asistencial, ha supuesto un importante avance en el tratamiento de un subtipo tumoral agresivo, incrementado la supervivencia libre de enfermedad a 5 años. Sin embargo existe un 25% de los pacientes en estadios tempranos que no responden al tratamiento [121,122]. Además, aproximadamente un

70% de los tumores metastásicos que inicialmente presentan una buena respuesta al tratamiento, progresan tras 6 u 8 meses de exposición continuada a la terapia anti-HER2 [123,124]. Esto es debido fundamentalmente a que en determinados tumores, existen otras alteraciones, no estudiadas o no determinadas en el práctica clínica, o simplemente no conocidas, que están implicadas en el proceso de proliferación tumoral o de metástasis; o bien porque el tumor desarrolla nuevas alteraciones moleculares para evadir el tratamiento. Además, gracias a la incorporación del estudio de perfiles moleculares, se ha demostrado que existe una importante heterogeneidad intratumoral, es decir que dentro de un mismo tumor se pueden detectar varias poblaciones con alteraciones moleculares diferentes que no tienen por qué presentar el mismo comportamiento ante determinados tratamientos [125].

Desde el punto de vista de resistencia se pueden distinguir dos tipos de resistencia al tratamiento; resistencia primaria o resistencia adquirida. El modelo de resistencia primaria viene definido por la presencia de alteraciones moleculares al diagnóstico de la enfermedad, que provocan que las células tumorales evadan el mecanismo de acción de la terapia anti-HER2 provocando que el tumor no se vea afectado por el tratamiento (Figura 7 B y C). De acuerdo a la heterogeneidad intratumoral las respuestas al tratamiento en resistencia primaria pueden ser diferentes. En presencia de un tumor monoclonal, en el que todas las células tumorales presentan alguna alteración molecular que confiere resistencia al tratamiento, se observará progresión de la enfermedad durante el tratamiento, normalmente en un plazo menor de 6 meses, o en un corto periodo tiempo una vez finalizado el tratamiento. Sin embargo, en presencia de un tumor heterogéneo, donde la gran mayoría de las células tumorales son sensibles a la terapia anti-HER2, y una proporción menor presenta resistencia primaria, se observará una respuesta parcial al tratamiento, eliminando las células sensibles y persistiendo las células resistentes, observándose una recaída de la enfermedad en un plazo corto de tiempo una vez finalizado el tratamiento [126]. El modelo de resistencia adquirida viene definido por un tumor primario sensible al tratamiento con terapia anti-HER2, que responde al tratamiento observándose una disminución del componente tumoral importante, pero que tras una exposición continuada al tratamiento surgen nuevos clones tumorales, que han adquirido alteraciones moleculares de novo, capaces de evadir el mecanismo de acción de la terapia anti-HER2, provocando una recaída de la enfermedad y una no respuesta al tratamiento (Figura 7 D) [124,126].

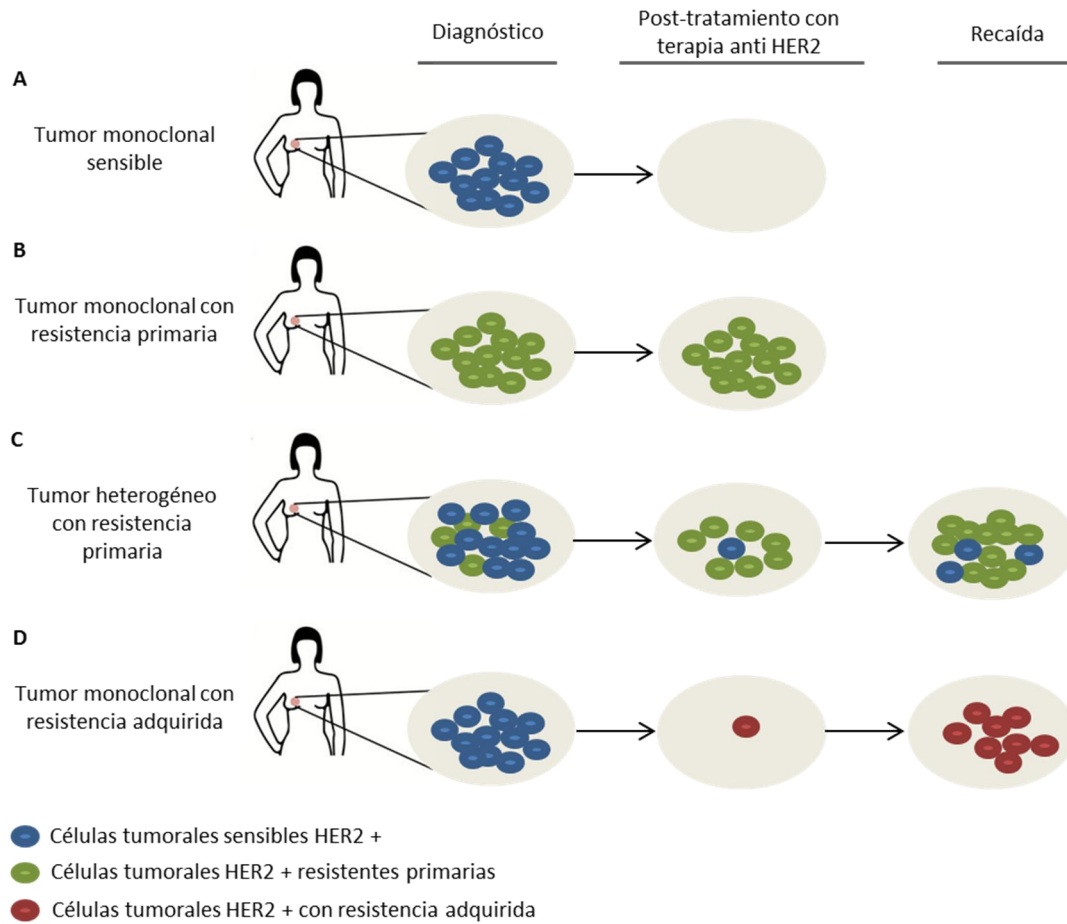


Figura 7. Imagen ilustrativa de los posibles modelos de resistencia primaria y resistencia adquirida en cáncer de mama HER2 positivo. **A)** Tumor de mama HER2 positivo homogéneo con sensibilidad al tratamiento con terapia anti HER2, que presenta respuesta patológica completa post-tratamiento. **B)** Tumor de mama HER2 positivo homogéneo con resistencia primaria a terapia anti HER2, no presenta respuesta al tratamiento. **C)** Tumor de mama HER2 positivo heterogéneo, con células tumorales sensibles al tratamiento y células con resistencia primaria, con una respuesta parcial al tratamiento y recaída. **D)** Tumor de mama HER2 positivo homogéneo, que presenta respuesta patológica completa post-tratamiento, observándose recaída de enfermedad por la adquisición de alteraciones moleculares *de novo*, tras una exposición continuada al tratamiento, que le confieren resistencia al tratamiento.

Se han definido diferentes mecanismos moleculares implicados en la resistencia a trastuzumab, tanto primaria como adquirida, que se pueden clasificar en tres niveles; 1) aumento de expresión de los ligandos de la familia EGF; 2) alteración en el receptor HER2 u otros miembros de la familia HER, o interacciones con otros receptores; y 3) activación constitutiva de la vías de señalización mediadas por HER2.

2.3.1 Aumento de la expresión de ligandos

El incremento de los ligandos específicos de la familia HER2 o de otras familias de receptores tirosina quinasa se ha descrito como un importante fenómeno de señalización compensatoria, provocando resistencia de terapia anti-HER2. La sobreexpresión de neuregulina se ha descrito como un importante mecanismo de resistencia, este ligando es el principal activador de la dimerización de HER2/HER3, sin embargo también provoca activación de HER4 [127,128]. Además, el incremento de IGF, ligando del IGF1R, provoca la sobre-activación de las rutas de señalización RAS/MAPKs y PI3K/AKT/mTOR [129].

2.3.2 Alteración a nivel de receptor

La principal alteración del receptor es la presencia de formas truncadas de HER2 (p95HER2), que carecen de dominio extracelular, por lo que trastuzumab no puede reconocer ni unirse al receptor y bloquear su actividad quinasa. La generación de p95HER2 se produce a partir del corte proteolítico de HER2 total, y se postula que la resistencia al trastuzumab podría estar mediada por la capacidad de selección de células tumorales que expresan p95HER2. La presencia de esta forma truncada se correlaciona con peor pronóstico en pacientes HER2 [130,131].

Recientemente, se han descrito mutaciones de HER2 y EGFR [132–134] como factores de resistencia al tratamiento anti-receptor. En series pequeñas de cáncer de mama, se han descrito mutaciones de HER2 [135] en los exones 19-21, que afectan a los dominios tirosina-quinasa con una incidencia menor al 5%. Estas mutaciones, se han asociado a peor pronóstico y a resistencia a lapatinib [136].

Otros mecanismos de resistencia implican el incremento o la activación constitutiva de otros receptores tirosina-quinasa capaces de activar las mismas rutas de señalización celular que HER2. La sobreexpresión del receptor c-MET provoca la activación de la ruta PI3K/AKT/mTOR, por lo que se produce una señalización intracelular compensatoria ante el bloqueo de la señalización de HER2 [137,138]. Lo mismo se ha descrito con la sobreexpresión del receptor IGF1R, que activa la cascada de RAS/MAPKs y PI3K/AKT/mTOR [139,140].

2.3.3 Activación constitutiva de las rutas de señalización mediadas por HER2

Cualquier alteración constitutiva en las cascadas de señalización RAS/MAPKs y PI3K/AKT/mTOR provocaría que los procesos de proliferación e invasión, continuasen activos independiente del bloqueo del receptor por trastuzumab.

Una de las principales alteraciones moleculares descritas en cáncer de mama que provocan este efecto, es la pérdida de expresión del supresor de tumores PTEN, principal punto de control de la cascada de PI3K/AKT/mTOR. Esta fosfatasa dual desfosforila a AKT impidiendo que continúe la cascada de activación. La pérdida de PTEN se ha descrito como un importante mecanismo de resistencia a trastuzumab, porque provoca la activación constitutiva de AKT, impidiendo el arresto celular y la inhibición de apoptosis que provocaría trastuzumab [141,142]. Esta pérdida de expresión de PTEN se ha demostrado que está presente en aproximadamente un 15% de los tumores de mama HER2 positivos, presentando una peor supervivencia libre de enfermedad y un peor respuesta al tratamiento con terapia anti-HER2 [143].

Además de la pérdida de PTEN, que en última instancia provocan la activación constitutiva de la ruta PI3K/AKT/mTOR, en 2004 se describe la presencia de mutaciones en PIK3CA, subunidad catalítica de PI3K, que provocan el mismo efecto de resistencia a trastuzumab. PI3K está constituido por dos subunidades catalíticas, p110 α (PIK3CA) y p110 β (PIK3CB), implicadas en la fosforilación de los miembros de la ruta, y una subunidad reguladora, p85 α (PIK3R1), que bloquea la actividad de las subunidades catalíticas en ausencia de señales [144]. Estas mutaciones están presentes en tumores de mama con una incidencia del 25-40%, siendo más prevalentes las mutaciones en los exones 9 y 20. Las mutaciones en el exón 9 impiden la interacción entre la subunidad p85 α y p110 α , mientras que las mutaciones en el exón 20, afectan al dominio de activación haciendo que la proteína este constitutivamente activa [145–147]. Esta activación constitutiva provoca la activación de las proteínas PDK1 y PDK2 que activan a AKT en los residuos Thr308 y Ser473 respectivamente [148].

Otros estudios han identificado mutaciones puntuales en AKT1, que provocan la activación constitutiva de la proteína y que por tanto son un importante mecanismo de resistencia al tratamiento con trastuzumab. Estas mutaciones se han descrito en varios tipos tumorales, estimándose que están presentes en un 6% de los tumores de mama [149].

Todas estas alteraciones y/o mutaciones provocan que la capacidad de trastuzumab para bloquear la activación de esta ruta no sea efectiva.

Independientemente de todos los mecanismos de resistencia a trastuzumab descritos en el apartado anterior, continúa existiendo un número importante de pacientes que presentan resistencia primaria al tratamiento con trastuzumab o bien adquieren distintos mecanismos de resistencia durante el tratamiento con trastuzumab.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El tratamiento con trastuzumab, con eficacia clínica demostrada en pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión/amplificación de HER2, presenta en 25% de tasas de no respuesta en pacientes con cáncer precoz y hasta un 70% de progresión en enfermedad metastásica. La caracterización de los mecanismos de resistencia primaria y adquirida y de los marcadores que los identifiquen, nos permitirán una mejor selección de las pacientes para las distintas opciones terapéuticas anti-HER2 emergentes. Además, la combinación de trastuzumab con otras terapias biológicas podría evitar o retrasar la aparición de estas resistencias.

Para confirmar o rechazar esta hipótesis, en la presente Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos principales

1. Identificar los mecanismos responsables de la resistencia primaria a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo.
2. Identificar los mecanismos de resistencia adquirida a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo.
3. Definir nuevos biomarcadores predictivos de resistencia a trastuzumab.
4. Desarrollar nuevas estrategias de intervención terapéutica y diagnóstica que reviertan las resistencias identificadas en base a combinaciones de trastuzumab con otros fármacos biológicos.

Sub-objetivos

1. Estudiar *in vitro* la sensibilidad a trastuzumab en un panel de líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo (resistencia primaria).
2. Generar líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo resistentes, a partir de la exposición continuada a trastuzumab (resistencia adquirida).
3. Identificar los factores moleculares predictivos de resistencia a trastuzumab mediante estudio diferencial de genes en los modelos preclínicos.
4. Confirmar los mecanismos de resistencia a trastuzumab identificados mediante estudios funcionales.
5. Definir las combinaciones *in vitro* de trastuzumab con otras terapias biológicas con actividad en los modelos de resistencia.
6. Trasladar los hallazgos a cohortes de pacientes con cáncer de mama HER2 positivos tratadas con trastuzumab.

Material y métodos

1. Líneas celulares de cáncer de mama

Para la realización in vitro de este trabajo se han empleado un panel de 8 líneas celulares de cáncer de mama con amplificación de HER2: BT-474, SK-BR-3, AU-565, EFM192A, HCC1954, HCC1419, HCC-1569 y JIMT1, las características moleculares de estas líneas se recogen en la tabla 6 [150,151].

Tabla 6. Características clínicas y moleculares de las líneas celulares de cáncer de mama empleadas en este trabajo.

Línea celular	Tipo tumoral	Origen	Clasificación molecular			
			Subtipo intrínseco *	RE	RP	HER2 **
BT-474	IDC	P.Br	Luminal	+	+	++
AU565	AC	PE	Luminal-ERBB2+	-	-	++
SK-BR-3	AC	PE	Luminal-ERBB2+	-	-	++
EFM19-2A	AC	PE	Luminal	+	+	++
HCC1419	IDC	P.Br	Luminal-ERBB2+	+	-	++
HCC1569	MC	P.Br	ER-negative-ERBB2+	-	-	++
HCC1954	Duc.Ca	P.Br	ER-negative-ERBB2+	-	-	++
JIMT1	Duc.Ca	PE	ER-negative-ERBB2+	-	-	+
MDA-MB-361	AC	P.Br	Luminal	+	+	++
UACC812	IDC	P.Br	Luminal	+	+	++

AC, adenocarcinoma; Duc.Ca, ductal carcinoma; IDC, invasive ductal carcinoma; MC, metaplastic carcinoma.

P.Br, primary breast; PE, pleural effusion

* Subtipo intrínseco: Las líneas celulares se han clasificado de acuerdo a su perfil de expresión intrínseco definido por Perou y colaboradores [36]

** HER2 sobreexpresión

Las líneas BT-474, SK-BR-3, AU-565, HCC1954, HCC1419, HCC1569, MDA-MB-361 y UACC812 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), mientras que las líneas EFM19-2A y JIMT1 fueron obtenidas de la German Tissue Repository DSMZ. BT-474, SK-BR-3 y JIMT1 fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco by Life Technologies, Gaithersburg, MD), 2 µM-glutamina,

GlutaMax (Gibco by Life Technologies, Gaithersburg, MD), y 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco by Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las líneas AU565, HCC-1954, HCC-1419 y HCC-1569 fueron cultivadas en RPMI 1640 (Gibco by Life Technologies, Gaithersburg, MD), suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, 2 µM L-glutamina, and 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina. Y la línea EFM192A fue cultivada en RPMI 1640, suplementado con 20% de suero bovino fetal inactivado, 2 µM L-glutamina, and 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina. Todas ellas fueron mantenidas en incubador de CO₂ a 37°C con 5% de CO₂.

El cultivo de todas las líneas se realizó en frascos especialmente preparados para crecimiento celular con ventilación. Se trabajó en cabinas de bioseguridad tipo II. En todos los casos se realizaban sub-cultivos antes de que el cultivo alcanzase el 70%-80% de confluencia mediante tripsina/EDTA 0,25% (Gibco by Life Technologies, Gaithersburg, MD), además el medio de cultivo fue renovado cada tres días. Los recuentos celulares para la siembra de los experimentos o los pases se realizan mediante el equipo Automated Cell Counter TC20 (Bio-Rad, Pleasanton, CA) con tripan blue.

2. Ensayos celulares

2.1 Reactivos

El Trastuzumab (Herceptin, Genentech Inc., San Francisco, CA) fue cedido por el servicio de farmacia de la Fundación Jiménez Díaz. Trastuzumab está disuelto en suero salino 0,9% a una concentración stock de 21 mg/ml. Maraviroc (MVC) fue adquirido a Selleckchem y reconstituido a una concentración final de 10 mM en DMSO de acuerdo a las especificaciones técnicas del producto. La proteína recombinante humana de RANTES (CCL5r) fue obtenida de R&D Systems, Minneapolis, MN, reconstituida a una concentración final de 100 µg/ml en PBS estéril con 0,1% de albumina de suero bovino fetal.

Como inhibidores de la ruta de PI3K/AKT/mTOR se emplearon everolimus (RAD001) de Selleckchem reconstituido en DMSO a una concentración stock de 10mM, BEZ235 (Dactolisib) de Selleckchem reconstituido en DMSO a una concentración stock de 10mM, e INK 128 (MLN0128) también adquirido a Selleckchem reconstituido a una concentración stock de 10 mM en DMSO.

Everolimus (Afinitor, Novartis), es un derivado de la rapamicina con capacidad de inhibir al complejo mTORC1 que provoca disminución de la proliferación celular provocados por la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT/mTOR e inhibe la proliferación linfocitaria mediada por

citoquinas. NVP-BEZ235 (Novartis Pharma), es un inhibidor selectivo que presenta capacidad de inhibición dual de PI3K y mTOR en el complejo mTORC1, debido a la alta similitud de los dominios tirosina quinasa de ambas proteínas. (Intellikine, Millennium Pharmaceuticals), es un inhibidor competitivo del dominio ATP de mTOR con capacidad de inhibir simultáneamente a los complejos mTORC1 y mTORC2.

2.2 Estudios de viabilidad celular mediante técnicas de MTS

El estudio de la viabilidad y la proliferación celular es un factor importante para evaluar las respuestas de una población celular frente a diferentes fármacos. En las líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas la viabilidad celular a los distintos fármacos empleados se evaluó mediante la sal de tetrazolio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), mediante el Kit CellTiter 96R AQueous Non-Radiative Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI)[152]. Este ensayo permite cuantificar las células metabólicamente activas que son capaces de llevar a cabo, mediante deshidrogenasas mitocondriales, la reducción de sales de tetrazolium a formazán. Las enzimas encargadas de producir esta reducción únicamente son funcionales en células viables, por lo que una baja formación de formazán implica una menor viabilidad celular.

Se realizó el estudio de viabilidad celular a trastuzumab en las BCCLs HER2 positivas empleando concentraciones entre 0,01 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab, a 72 horas de tratamiento. Las concentraciones testadas fueron seleccionadas de acuerdo a lo descrito en la literatura. El ensayo se llevó a cabo en placas tratadas de 96 pocillos sembrando 1×10^4 células por pocillo en 100 μl de medio completo correspondiente a cada línea, añadiéndose tras 24 horas, 100 μl de medio más trastuzumab a las distintas concentraciones en 100 μl de medio. Después de 72 horas de tratamiento, se añadieron 20 μl del reactivo MTS, y se incubó la placa en oscuridad a 37°C durante 2 horas. La cantidad de formazán reducida se midió mediante el lector de microplacas Sunrise (Tecan) a 490nm.

2.3 Valoración de sensibilidad a fármacos en líneas de cáncer de mama

Se valoró la sensibilidad a los diferentes fármacos estudiados en este trabajo mediante ensayos de proliferación celular en presencia y ausencia de tratamiento a 7 días, renovando el medio y el fármaco cada 3 días. Para la realización de estos ensayos se sembraron entre $3 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ células en placas p100, tras 24 horas se incubó a 37°C en atmósfera de CO_2 para que se adhirieran a la superficie de la placa, se trataron los pocillos indicados con el tratamiento

correspondiente y a los 7 días se realiza el conteo de células mediante el equipo Automated Cell Counter TC20 (Bio-Rad, Pleasanton, CA) con tripan blue.

La respuesta a los distintos tratamientos se cuantificó obteniendo el porcentaje de células tratadas respecto a su control sin tratamiento. Además, para valorar si existe resistencia a los distintos tratamientos, se aplicó el algoritmo descrito por O'Brien, que indica el tiempo de doblaje de las células y relaciona la tasa de crecimiento entre las células tratadas y las no tratadas[153]. De este modo aquellas líneas celulares cuyo *fold change in growth rate* (ΔGR) fuera $\geq 1,2$ y presentasen una disminución del 20% en número de células tratadas entre las no tratadas, fueron consideradas como sensibles a al tratamiento.

2.4 Generación de líneas celulares de cáncer de mama resistentes a trastuzumab (resistencia adquirida)

De todas las líneas celulares de cáncer de mama definidas como sensibles a trastuzumab se han generado tres poblaciones resistentes a trastuzumab por línea, mediante la exposición continuada al fármaco durante un período variable de entre tres y ocho meses. Las células se fueron tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab durante los primeros 30 días, incrementando la concentración a 15 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab en los meses posteriores. De forma paralela y simultánea se cultivó la línea parental sin tratamiento, que mantiene su sensibilidad al fármaco y actúa como control del procedimiento. Mensualmente se valoró la evolución de la resistencia mediante la realización de ensayos de proliferación celular en presencia y ausencia de trastuzumab a 7 días (apartado 2.3), la respuesta a trastuzumab aplicando el algoritmo que indica el tiempo de doblaje de las células y relaciona la tasa de crecimiento entre las células tratadas y las no tratadas [153]. De cada línea celular se seleccionó el pool que presentaba mayor porcentaje de crecimiento tras el tratamiento con trastuzumab durante 7 días. A partir del pool seleccionado se aislaron clones mediante el método de dilución extrema. En placas de 6 pocillos se realizaron diluciones seriadas, partiendo de 250.000 células/ 200 μl de cada uno de los pools seleccionados, hasta llegar a una dilución extrema de 1 célula/ μl . Transcurrido el tiempo se seleccionaron los pocillos en los que se detectó crecimiento celular a partir de esa única célula, y se realizó crecimiento del cultivo.

2.5 Ensayo clonogénico

El ensayo clonogénico o ensayo de formación de colonias, permite valorar el efecto de un determinado fármaco en la capacidad proliferativa de células adherentes en cultivo a largo

plazo. En este trabajo, este experimento nos permite evaluar la resistencia de las líneas celulares con resistencia primaria a trastuzumab, así como la resistencia de las líneas resistentes a trastuzumab generadas (resistencia adquirida).

Se sembraron 1×10^3 de las líneas SK-BR-3, AU565, EFM19-2 A, HCC1416, HCC1954 y JIMT1; y 2×10^3 de las líneas celulares BT-474 y HCC1569, por duplicado en frascos de 25 cm², tras 24 horas de incubación para permitir la adherencia, se comenzaron a tratar con trastuzumab a una concentración de 1 µg/ml, o con vehículo. El medio y los tratamientos se renovaron cada tres días. Tras 21 días de tratamiento las colonias formadas se tiñeron con 2 ml de cristal violeta 1% en etanol durante 15 minutos, los restos del colorante se aclararon con sucesivos lavados con PBS 1 x. Se tomaron imágenes representativas de toda la superficie de cada frasco con la cámara Olympus SC30 (Olympus Corp., Tokyo, Japan) acoplada al microscopio invertido Olympus CKX41 (Olympus Corp., Tokyo, Japan). Se valoraron el número total de colonias y el área de las mismas mediante el programa ImageJ.

2.6 Silenciamiento transitorios de genes de interés en líneas celulares

Los silenciamiento transitorios, a través de ARNs de interferencia, ARNsi (ARN pequeños de interferencia) que permiten reducir de forma temporal y reversible los niveles de ARN de interés. Se trata de secuencias de ARN de doble cadena de aproximadamente 20-25pb complementarias a regiones funcionales del ARN de interés, que provocan la degradación específica del ARNm y la disminución de los niveles de expresión de proteína.

Se ha realizado silenciamiento transitorio para CCL5 y CCR5, empleando los siguientes ARNsi: siGENOME SMART pool siARN-CCL5 (M007844), siGENOME SMART pool siARN-CCR5 (M004855) y siGENOME Non-Targeting ARNsi (D001210-01) (Dharmacon, Lafayette, CO), usando como agente de transfección el lípido catiónico sintético, Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA).

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos, silenciamiento durante 48 y 72 horas para valorar el efecto molecular de la disminución de los genes estudiados, y silenciamiento durante 7 días para evaluar el efecto de la disminución de los genes estudiados en proliferación celular en presencia o ausencia de trastuzumab y otros agentes, en este caso se realizaron dos silenciamientos durante la duración del experimento. Ambos ensayos se realizaron en placas tratadas de 6 pocillos sembrando $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en medio completo sin trastuzumab. Después de 4 días de cultivo se sustituyó el medio completo por medio al 13% de SBF y sin antibióticos, transcurridas 8 horas se realizó la transfección añadiendo a cada pocillo 5 µg de

Lipofectamine 2000 y ARNsi a una concentración 50 nM, diluidos en 500 µl de Opti-MEM I Reduced Serum Media (Gibco by Life Technologies, Gaithersburg, MD). Después de 12-16 horas se paró la transfección retirando el medio, se lavó con PBS 1 x y se añadió medio completo con o sin tratamiento según corresponda. En los ensayos de valoración del efecto molecular, tras 48 y/o 72 horas desde el inicio de la transfección se recogió ARN o proteína según el protocolo establecido (apartados 3.2 y 3.8). Mientras que en los ensayos de proliferación, después de 3 días desde la primera transfección se realizó una segunda transfección siguiendo el mismo protocolo, y se realizó recuento celular a 7 días mediante el equipo Automated Cell Counter TC20 (Bio-Rad, Pleasanton, CA) con tripan blue, también se recogió ARN o proteína según el protocolo establecido (apartados 3.2 y 3.8).

DÍA			
-5	JUEVES		Siembra 250000 cells/pocillo Medio completo
-1	LUNES	9:00	Quitar medio - lavar - Añadir 1,5ml medio sin P/S, 13%FBS
		17:00	1ª TRANSFECCIÓN
0	MARTES	9:00	24h STOP transfección - lavar - Añadir medio completo ±TzM
			RNA --> RLT--> -80°C
1	MIÉRCOLES	17:00	48h RNA --> RLT--> -80°C //PROTEÍNA --> EXTRACCIÓN --> -20°C
2	JUEVES	9:00	72h Quitar medio - lavar - Añadir medio sin P/S, sinTzM
		17:00	2ª TRANSFECCIÓN PROTEÍNA --> EXTRACCIÓN --> -20°C
3	VIERNES	17:00	24h STOP transfección - lavar - TRIPSINIZAR --> P100 con medio completo ±TzM
4	SÁBADO	9:00	48h
5	DOMINGO	9:00	72h
6	LUNES	9:00	
7	MARTES	9:00	Recuento tras 7 días de exposición a TzM Dividir PELLET (1/2): RNA --> RLT--> -80°C PROTEÍNA --> EXTRACCIÓN --> -20°C

Figura 8. Esquema representativo del experimento de silenciamiento génico realizado mediante ARNsi a 7 días.

3. Ensayos moleculares

3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las líneas celulares de cáncer de mama se llevó a cabo mediante el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, GE). Este kit permite la purificación de 15-20 µg totales de ADN partiendo de 10^4 - 10^7 células en cultivo.

Se basa en un sistema de columnas con membrana de sílica que permite la unión de los ácidos nucleicos.

El ADN se purifica a partir de $1,5 \times 10^6$ de células en cultivo, resuspendiendo en 200 μ l de PBS 1x y añadiendo 200 μ l de Binding buffer que contiene guanidina, más 40 μ l de proteinasa K para disgregar las células, se incubó 10 minutos a 37°C. Tras esta incubación, se añadieron 100 μ l de isopropanol, se homogenizó y se transfirió todo el volumen a la columna High Pure FilterTubes, donde tras centrifugar quedan retenidos los ácidos nucleicos. Después, se procedió con el proceso de lavado para eliminar restos celulares. Se añadió a la columna 500 μ l del buffer Inhibitor Removal de contiene etanol absoluto más guanidina, se centrifugó 1 minuto a 8.000 x g. Se descartó el eluido y se realizaron dos lavados con 500 μ l de Wash Buffer. Tras secar la membrana completamente mediante 1 minuto de centrifugación a máxima velocidad se añadieron 50 μ l de Elution Buffer atemperado. Después de centrifugar 1 minuto a máxima velocidad, se obtuvo el ADN que se cuantificó mediante espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

3.2. Extracción de ARN

La purificación de ARN a partir de cultivos celulares se llevó a cabo mediante el kit comercial RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany), este kit se basa en la unión selectiva de los ácidos nucleicos a las membranas de sílica. La lisis y homogenización de la muestra se basa en un buffer que contiene guanidina de tiocianato que permite la inactivación de las ARNasas, evitando la degradación del ARN. Además, para evitar contaminación con ADN, se incluyó una digestión con ADNasas que degrada el ADN presente en la muestra.

La extracción de ARN se realizó en placas de 6 pocillos que contienen entre 1 y 2×10^6 células. Tras retirar el medio de cultivo y lavar con PBS 1x, las células se lisaron directamente sobre la placa con 350 μ l de buffer RLT suplementado con 3,5 μ l de β -mercaptoetanol que favorece la desnaturalización de las ARNasas, se recogió el lisado tras raspar la superficie con rasqueta asegurando recoger todo el volumen. Se añadió al lisado 350 μ l de etanol al 70% y se transfirió todo el volumen a la columna con la membrana de sílica, RNeasy Mini Spin. Después de centrifugar las columnas, los ácidos nucleicos fueron retenidos en la membrana y en el eluido encontramos las proteínas y otros componentes celulares. Posteriormente, se realizó un lavado de la membrana con 350 μ l del buffer RW1, centrifugando durante 15 segundos a ≥ 8.000 x g, y se incubó la membrana durante 30 minutos con 80 μ l de buffer RDD con ADNasas para la degradación del ADN. Se realizaron sucesivos lavados con el buffer RW1 y con el buffer RPE,

para eliminar los restos de ADN y otras sustancias. Finalmente, se procedió con la elución del ARN, añadiendo sobre la membrana de la columna 30 μ l de agua libre de ARNasas atemperada a 37°C, se centrifugó 1 minuto a \geq de 10.000 x g, y se obtuvo el eluido. La cuantificación del ARN obtenido se analizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). El ARN se almacena a -80°C.

3.3. Control de calidad de ARN

La degradación del ARNm influye sustancialmente en el estudio de los niveles de expresión llevados a cabo mediante técnicas de *arrays* de expresión o RT-PCR. El espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), nos ofrece información sobre la pureza del ARN mediante el valor del ratio de la absorbancia a 260/280 y 260/230. Un valor del ratio 260/280 superior a 2 se considera óptimo, valores inferiores a 1,8 indica la presencia de contaminación por proteínas o fenoles. El valor del ratio 260/230 debe oscilar entre 1,8 y 2,2, valores inferiores evidencian una mala purificación del ARN, indicando la presencia de contaminación con restos celulares, fenoles o sales de guanidina que podrían inhibir la PCR. Para la realización de los estudios de expresión llevados a cabo en este trabajo únicamente se incluyeron aquellas muestras con valores de pureza de 260/280 \geq 2 y 260/230 \geq 1,8. La valoración de la integridad del ARNm se realizó en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, La Jolla, CA) mediante métodos de placas microfluídicas, con el kit Agilent ARN6000 Nano kit (Agilent Technologies, La Jolla, CA). Este equipo cuantifica la integridad del ARN mediante un algoritmo que se basa en la integridad del ARN ribosómico 28S y 18S presentes en la muestra y genera un valor de 0 al 10 de integridad de ARN, RIN (ARN Integrity Number), donde un valor de RIN 0 indica degradación completa del ARN, valores de RIN \geq 7 se consideran aceptables y aptos para estudios de arrays de expresión [154]. Todas las muestras de ARN obtenido a partir de líneas celulares presentaron un valor de RIN \geq 8, siendo óptimas para la realización de estudios de expresión.

3.4. Síntesis de ADNc

Para analizar los niveles de expresión de genes es necesaria realizar la retrotranscripción del ARN extraído a ADN complementario (ADNc). En este trabajo se empleó el kit Transcriptor Universal ADNc Master (Roche Applied Science, Mannheim, GE). Se prepararon 1.000 ng de ADNc una concentración final de 50 ng/ μ l en un volumen final de 20 μ l. La síntesis del ADNc se lleva a cabo en el GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), con un paso

de annealing durante 5 minutos a 25°C, seguido de un paso de retrotranscripción de 10 minutos a 55°C, y un paso de inactivación de 5 minutos a 85°C.

3.5. Análisis de perfiles de expresión a partir de la base de datos Cancer Cell Encyclopedia

A partir del repositorio de datos Cancer Cell Encyclopedia (<https://portals.broadinstitute.org/ccle/home>), se descargaron los datos de alteraciones genómicas (mutaciones puntuales y número de copias de todos los genes codificantes) y datos transcriptómicos de las líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas, en enero de 2015. Se separaron los datos de alteraciones genómicas y datos transcriptómicos en base a la sensibilidad a trastuzumab, agrupando las líneas celulares definidas como resistentes primarias a trastuzumab frente a las líneas sensibles a trastuzumab. A continuación, se identificó un conjunto de genes upregulados en el grupo de líneas celulares con resistencia primaria a trastuzumab frente al grupo de líneas definidas como sensibles a trastuzumab.

3.6. Análisis de perfiles de expresión génica por microarrays

Los microarrays de expresión fueron realizados en el servicio del Servei d'Anàlisi de Microarrays IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona), mediante la plataforma Affymetrix Human Gene ST 2.0 Arrays ST (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA). Este chip incluye más de 47.000 transcritos codificables y no codificables, cada transcrito presenta una media de 21 sondas o *probe set* de 25 pares de bases cada una, de ese modo se en el *array* se valoran hasta 525 bases por transcrito.

Para la realización de los microarrays de expresión de empleo el ARN obtenido de dos replicas independientes, de acuerdo al protocolo de extracción de ARN, a partir de $1,5 \times 10^6$ células de las líneas BT-474, BT-474.R, SK-BR-3, SK-BR-3.R tratadas y no tratadas con 15µg/ml de trastuzumab durante 48 horas y de las líneas AU565, AU565.R, EFM19-2A y EFM19-2 A.R tras 48 horas de siembra. La cuantificación y valoración de la calidad del ARN se determinó mediante NanoDrop ND-2000 (Thermo FisherScientific, Waltham, MA), y kit Agilent ARN6000 Nano kit en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, La Jolla, CA). A partir de 1µg del ARN total extraído de cada una de las muestras, se sintetizó ADNc con el One-Cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA), posteriormente se procedió con la síntesis del ADNc y su marcaje con biotina, empleando el kit GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA). Tras la purificación del ADNc mediante el kit GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix

Inc, Santa Clara, CA), se realizó la fragmentación del ADNc biotinilado mediante hidrólisis en la que se obtuvieron fragmentos de 50-200 pb, después de cuantificar las muestras fragmentadas se realizó la hibridación con GeneChip Affymetrix Human Gene ST 2.0 Arrays ST durante 16 horas a 45°C en el horno de hibridación GeneChip 640. Una vez finalizado el proceso de hibridación el array se tiñó en la Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 y escaneado en el escáner de chips GeneChip Scanner 3000 Targeted Genotyping System (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA).

La normalización de los niveles de expresión de las sondas en las 8 muestras fue hecha utilizando el método *Robust Multiarray Average* (RMA) implementado en el paquete oligo v.1.38 [155] disponible en la librería de análisis estadísticos Bioconductor, [156] (<https://www.bioconductor.org>). La anotación de las sondas a genes se realizó utilizando el paquete *hugene20sttranscriptcluster.db* v.8.5.0 también disponible en Bioconductor. Los niveles de expresión normalizados de genes con varias sondas fueron resumidos utilizando la media de todos ellos. El análisis de expresión diferencial de genes en las clases representadas en las 8 muestras se realizó a través de la plataforma de análisis Babelomics 5 [157] (<http://www.babelomics.org>) utilizando los métodos estadísticos implementados en el paquete limma (Bioconductors) y el test de Student. Los p-valores fueron ajustados con el fin de controlar el False Discovery Rate (FDR) utilizando el método propuesto por Benjamini & Hochberg y el nivel de significancia se fijó en menos de 0.05.

El análisis de enriquecimiento funcional para extraer funciones sobre-representadas en alguna de las condiciones se realizó utilizando dos métodos diferentes implementados en Babelomics: i) Single enrichment o enriquecimiento clásico y ii) Gene Set enrichment [158]. Se utilizaron las funciones y rutas anotadas en la ontología Gene Ontology [159] (proporcionada por Babelomics) y la base de datos KEGG [160] (anotación extraída utilizando el servicio KEGG rest <http://www.kegg.jp/kegg/rest>).

3.7. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

Esta técnica nos permite realizar una cuantificación relativa de la expresión de un determinado transcrito respecto a una condición de referencia.

Para la realización de la cuantificación mediante RT-PCR, se extrajo el ARN a partir de $1,5 \times 10^6$ y se realizó la síntesis de 1000 ng de ADNc de acuerdo a lo descrito en los apartados 3.2 y 3.4 de este trabajo. El diseño de primers se realizó empleando el programa DNASTar Primer design (DNASTAR, Inc, Madison, WI) y la base de datos del NCBI. Se diseñaron primers para los

siguientes ARNm: CCL5, CCR5, CXCL10, CXCL11, IFN λ 1, IFN λ 2 y ATP5E, como gen de referencia. Los diseños de los primers Fw y Rv para cada uno de los genes se recogen en la tabla 7.

Tabla 7. Listado de primers diseñados para cada uno de los genes seleccionados.

Gen	Primers 5'-3'
CCL5 (NM_002985 variant 1, NM_001278736 variant 2)	Fw CTCATTGCTACTGCCCTCTG
	Rv GAAATACTCCTTGATGTGGGC
CCR5 (NM_000579.3 variant A, NM_001100168.1 variant B)	Fw CTCCCCGGGTGGAACAAGA
	Rv GAACACCAGTGAGTAGAGCG
CXCL10 (NM_001565)	Fw GCTTAGACATATTCTGAGCCT
	Rv GAGAGGTACTCCTTGAATGC
CXCL11 (NM_005409)	Fw CCTTGGCTGTGATATTGTGTGC
	Rv CTTTCACTGCTTTTACCCAG
IFN λ 1 (NM_172140)	Fw GAGGCTTCTCCAGGTGAGG
	Rv CTCCAGGACCTTCAGCGTC
IFN λ 2 (NM_172138)	Fw CCTGGTGGACGTCTTGGAC
	Rv GGCTGGTCCAAGACGTCCA
ATP5E (NM_006886.2, y NM_001001977.1)	Fw CCGGCGTCTTGGCGATTG
	Rv GATCTGGGAGTATCGGATG

La detección de la expresión de los distintos genes estudiados se realizó mediante el sistema de Universal Probe Library, UPLs (Roche Applied Science, Mannheim, GE), seleccionando una sonda o prueba marcada específica para cada una de las parejas de primers diseñados. Las PCRs se realizaron con 10 ng de ADNc por ensayo en placas 384, con 1x de Master Mx, y a una concentración final de 0,2 μ M de la pareja de primers y de la sonda UPL en el equipo LightCycler 480 II real-time PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, GE), de acuerdo a las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos en dos pasos, desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, y paso de hibridación a 60-64°C durante 30 segundos. Los resultados obtenidos fueron procesados por el software LightCycler 480 (Roche Applied Science, Mannheim, GE) mediante la función Advanced Relative

Quantification. La expresión relativa de los transcritos estudiados se calculó de acuerdo al método Pfaffl (Pfaffl, 2001), empleando como referencia los niveles de expresión de ATP5E.

3.8. Extracción de proteínas

La extracción de proteína total a partir de las BCCLs permite realizar estudios posteriores mediante western blot (WB) o ELISA de la expresión o modulación de las dianas estudiadas en este trabajo. La extracción de proteínas se llevó a cabo a partir de $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ de células lisando sobre placa en frío con 120-150 μ l de buffer de lisis RIPA (25mM Tris-HCL pH 7, 150mM de NaCl, 5mM EDTA pH 8.0, y 1% NP-40) suplementado con inhibidores de fosfatasa, PhosSTOP Easy Pack (Roche) e inhibidores de proteasas Complete ULTRA Tablets mini (Roche). Los lisados se recogieron en tubos eppendorf dejando lisar durante 10 min en frío, tras este tiempo se sonicaron, para fragmentar los ácidos nucleicos y permitir la liberación de proteínas unidas a ellos. Después, se centrifugaron durante 15 minutos a máxima velocidad y a 4°C, para eliminar los restos celulares, el sobrenadante con la proteínas se transfirió a otro tubos y se almaceno congelado a -20°C. Todo el proceso se realizó en hielo y en un tiempo inferior a 35 minutos, para asegurar la integridad de la formas fosforiladas en los extractos.

La cuantificación de los extractos de proteína se realizó por el método colorimétrico del ácido bicinonínico o BCA [162], mediante el kit Pierce BCA Protein Assay (Pierce). Este método se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} producida por las proteínas en medio alcalino, los iones Cu^{1+} generados se unen selectivamente al ácido bicinonínico provocando el viraje del medio de verde a púrpura, con absorbancia a 562 nm. La cuantificación se realizó por duplicado con dos diluciones (1/5 y 1/10) de las muestras, en placas de 96 pocillos, midiendo la absorbancia a 562 nm en el lector de multiplacas (Sunrise TECAN). La determinación de la concentración de proteínas se realizó incluyendo una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA.

3.9. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y Western Blot

De forma general la técnica de la electroforesis permite la separación de moléculas según su movilidad al ser sometidas a un campo eléctrico. Concretamente la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), permite la separación de las proteínas desnaturalizadas en base a su peso molecular. Las muestras son desnaturalizadas mediante SDS, que provoca la pérdida de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas y las confiere carga negativa, además, mediante β -mercaptoetanol que rompe los enlaces disulfuro de las proteínas. La técnica de

western blot o inmunoblot permite identificar las proteínas separadas por su peso molecular inmovilizadas en membranas.

Se prepararon 20 µg de proteína total en tampón de carga 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Pleasanton, CA) que contiene, 62,5 mM Tris- HCL, 10% glicerol, 1% de SDS, Y 0,005% de azul de bromofenol, con una pH 6.8, y desnaturalizadas durante 5 minutos a 95°C. Las proteínas se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% o 12% de acrilamida (29:1 acrilamida: bis acrilamida), sometiénolas a un campo eléctrico de constante de 200 V durante 50 minutos o 1 hora en buffer Tris/Glicina/SDS pH 8,3 1X. Tras la electroforesis los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia en condiciones húmedas en el sistema miniprotein II (Bio-Rad, Pleasanton, CA), a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora en frío en buffer Tris/Glicina pH 8,3 1X más 20% de metanol. Después de la transferencia se procedió con el protocolo de inmunodetección. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas se bloquearon en agitación a temperatura ambiente con 5% de BSA en 1X PBS 0,05% de Tween-20, durante 1 hora, después se realizaron tres lavados en agitación de 10 minutos cada uno, con solución de lavado, 1X PBS 0,1% de Tween-20. A continuación las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en 5% de BSA en 1X PBS, la dilución de los anticuerpos y las condiciones de incubación dependen de cada anticuerpo primario. Para eliminar los restos de anticuerpo primario las membranas se lavaron con solución de lavado en agitación durante 10 minutos, repitiendo este paso tres veces. Finalmente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina, anti-rabbit IgG (Fc specific) ALP, anti-mouse IgG (Fc specific) Alkaline Phosphatase antibody y Anti goat IgG (Fc specific) Alkaline Phosphatase antibody (Sigma), en función de la especie del anticuerpo primario, diluyéndolos 1: 10.000 en 5% de BSA en 1X PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de anticuerpo realizando tres lavados de 10 minutos con solución de lavado. El revelado de las membranas se realizó mediante el Tropix CSPD y Tropix Nitro Block II (Applied Biosystems, Foster City, CA), primero la membranas se estabilizaron en tampón Tris-NaCl 0,1 M pH 9,5 durante 5 minutos en agitación, a continuación se incubaron 5 minutos en solución de revelado 30 µl de Tropix Nitro Block II por cada 1 ml de Tropix CSPD, inmediatamente después se visualizaron las señales de los anticuerpos empleados mediante el equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL). Con el programa ImageQuant TL v8.1 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL) se realizó densitometría de las bandas permitiendo obtener una valoración semicuantitativa de la cantidad de proteína presente en la muestra.

Tabla 8. Listado de anticuerpos primarios empleados en este trabajo.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Dilución	Tiempo de incubación
Human CCL5/RANTES antibody Polyclonal Goat IgG	AF-278-NA	R&D Systems	1:1000	Overnight
AKT (Pan) (11E7) Rabbit mAb	#4685	Cell Signaling	1:1000	Overnight
Phospho-AKT (Ser473) (D9E) Rabbit mAb	#4060	Cell Signaling	1:1000	Overnight
Phospho-AKT (Thr308) (244F9) Rabbit mAb	#4056	Cell Signaling	1:1000	Overnight
p44/42 MAPK (Erk 1/2) (137F5) Rabbit mAb	#4695	Cell Signaling	1:1000	Overnight
Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) Rabbit mAb	#4370	Cell Signaling	1:1000	Overnight
HER2/ErbB2 (D8F12) XP Rabbit mAb	#4290	Cell Signaling	1:500	Overnight
S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb	#2217	Cell Signaling	1:500	Overnight
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Antibody, Rabbit	#2211	Cell Signaling	1:1000	Overnight
4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb	#9644	Cell Signaling	1:500	Overnight
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) Rabbit mAb	#2855	Cell Signaling	1:500	Overnight
Phospho-4E-BP1 (Thr70) Antibody, Rabbit	#9455	Cell Signaling	1:500	Overnight
Anti-GAPDH antibody produced in rabbit	SAB2100894	Sigma	1:10000	1 h

3.10. Ensayo de array de anticuerpos anti fosfo-tirosina-quinasa

Este ensayo permite cuantificar los niveles de expresión de un panel de proteínas en su forma fosforilada. Se empleó el kit PathScan RTK Signaling Antibody Array #7982 (Cell Signaling

Technology, Inc, Danvers, MA), que permite la identificación diferentes formas fosforiladas correspondientes a 28 receptores y 11 efectores relevantes de las vías de señalización implicadas en la respuesta a trastuzumab (Figura 9). Los extractos de proteína se obtuvieron empleando 500 µl del buffer Cell Lysis Buffer 1X (Cell Signaling), y se cuantificaron mediante el kit Pierce BCA Protein Assay (Pierce). Se incubaron en el array para la hibridación contra los anticuerpos impresos en la membrana y las señales se detectaron a través del sustrato quimioluminiscente, con los reactivos LumiGLO Reagent 20X y Peroxide 20X (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA), de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Las imágenes obtenidas después del procesamiento automático obtenidas con el equipo Amersham Imager 600RGB (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL), se densitometraron con el software ImageQuant TL v8.1 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL). Tras sustraer la señal del control negativo a cada uno de los puntos, la intensidad promedio de las señales específicas de cada diana se normalizó respecto a los controles positivos. Los valores de fold-change se calcularon para cada diana independiente en cada línea celular.

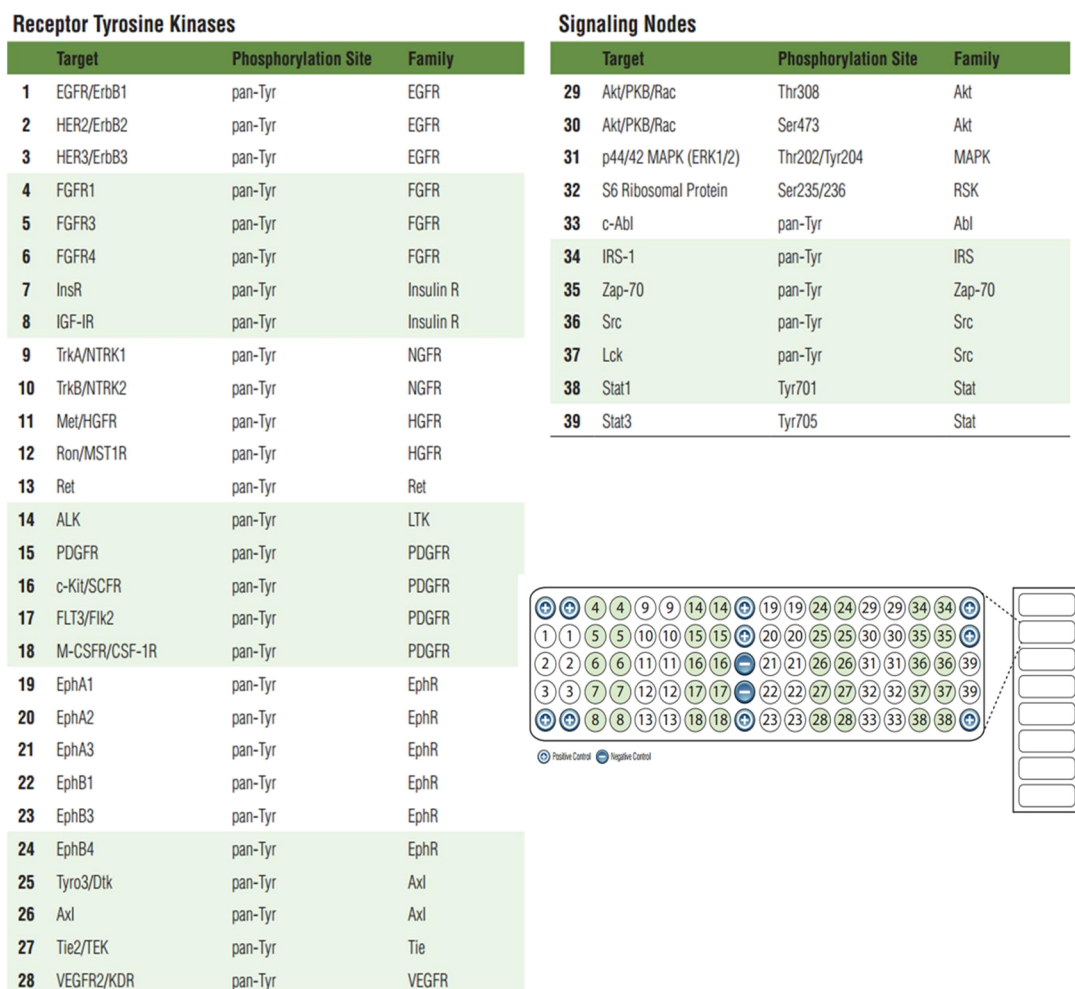


Figura 9. Resumen y esquema de las formas fosforiladas de los receptores tirosina quinasa y de las proteínas de señalización que reconoce el kit PathScan RTK Signaling Antibody Array.

3.11. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) es un método de localización específica de antígenos en tejidos o en células, basado en el reconocimiento antígeno-anticuerpo empleando para ello sistemas de detección enzimáticos. La IHQ es una reacción secuencial que utiliza las propiedades específicas de los anticuerpos (gran especificidad y alta afinidad) para identificar, localizar y teñir moléculas en secciones de tejido.

Las inmunotinciones se realizaron sobre secciones de 3 μm de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded), en portaobjetos tratados FLEX IHC Microscope Slides (Dako, Glostrup, Denmark). Los portaobjetos con las secciones se estufaron 1 hora a 56°C para permitir que el corte quede perfectamente adherido antes de proceder con la tinción. En primer lugar se realizó en proceso de desparafinización y recuperación antigénica mediante solución EnVision FLEX Target Retrieval Solution, pH alto (Dako, Glostrup, Denmark) en el equipo PT-Link (Dako, Glostrup, Denmark) con una rampa de temperatura hasta alcanzar 95°C durante 20 minutos. Tras este proceso, la tinción se realizó de forma automatizada en el equipo Autostainer Link 48 (Dako, Glostrup, Denmark) empleando el kit EnVision+ System-HRP (DAB) (Dako, Glostrup, Denmark). Después de varios lavados con EnVision FLEX Wash Buffer 1X, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena mediante EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent durante 10 minutos, tras varios lavados, se incubaron los portaobjetos con 400 μl de anticuerpo primario diluido en EnVision FLEX Antibody Diluent, la dilución y el tiempo de incubación dependió de cada anticuerpo. Transcurrido este tiempo se incubaron con EnVision FLEX/HRP, polímero de dextrano unido al anticuerpo secundario de cabra contra inmunoglobulinas de conejo/ratón y moléculas de peroxidasa, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para la tinción de algunos anticuerpos fue necesario incluir un paso intermedio para amplificar la señal incubando 20 minutos con EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER), que incrementa la señal en 2-3 veces. Después de la incubación con EnVision FLEX/HRP, las secciones se visualizan con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, añadiendo el reactivo EnVision FLEX DAB+ Chromogen durante 10 minutos, seguido de la contratinción con EnVision FLEX Hematoxylin durante 5 minutos. Una vez finalizada la tinción los portaobjetos se montaron en el montador automático CoverStainer (Dako, Glostrup, Denmark).

En todas las tinciones se incluyeron controles positivos, secciones de tumores de mama con expresión conocida de los anticuerpos empleados, en el caso de CCL5 se empleó como control positivo secciones de ganglio linfático, que presenta alta expresión de esta proteína. Los

controles negativos empleados fueron secciones incubadas con únicamente con anticuerpo secundario sin incluir la incubación con anticuerpo primario.

Tabla 9. Listado de anticuerpos primarios empleados en este trabajo para la realización de IHQ.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Dilución	Tiempo de incubación
Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α , Clone EP1	IR084	DAKO	Ready to use	20 min
Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 1294	M3568	DAKO	1:50	20 min
HercepTest™	SK00121	DAKO	Ready to use	30 min
Human CCL5/RANTES antibody	AF-278-NA	R&D	1:40	30 min
Policlonal Goat IgG		Systems		
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb	#9664	Cell Signaling	1:100	20 min
Phospho-Histone H3 (Ser10) (D7N8E) XP Rabbit mAb	#53348	Cell Signaling	1:100	20 min

Las tinciones fueron valoradas mediante microscopia óptica por un patólogo especializado en patología mamaria. La expresión de ER y PR se valoró de acuerdo a las guías consenso considerando positividad la existencia de tinción nuclear $> 1\%$ bajo adecuados controles positivos y negativos [25]. La expresión de HER2 se realizó en base a los criterios establecidos, detectando sobreexpresión en los casos en los que exista $\geq 10\%$ de tinción de membrana completa e intensa [29].

En el caso de CCL5 no existen criterios definidos para la valoración. Por este motivo se estableció un algoritmo de valoración donde se determinó el porcentaje de células tumorales con expresión citoplasmática y la intensidad de la tinción, clasificándola en baja (1), media (2) y alta (3). Después de valorar la tinción de CCL5 en todas las muestras, se calculó un *H-score* semicuantitativo para cada tinción individual de CCL5. Se aplicó la siguiente fórmula, pudiéndose obtener valores desde un mínimo de 0 hasta un máximo de 300:

$$H\text{-score} = (\% \text{ intensidad bajo}) \times 1 + (\% \text{ intensidad medio}) \times 2 + (\% \text{ intensidad alta}) \times 3$$

3.12. Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente se emplea en la práctica habitual para la detección de anomalías cromosómicas, como fusión de genes, amplificaciones, aneuploidías, pérdidas de regiones cromosómicas o cromosomas enteros. Se basa esencialmente en el principio de annealing del ADN a su ADN complementario.

El FISH se determinó sobre secciones de 3µm de muestras FFPE empleando portaobjetos tratados Superfrost Plus Microscope Slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los portaobjetos se estufaron durante 1 hora a 60°C, posteriormente se realizó la desparafinización con dos pases por xilol de 10 minutos, seguido de hidratación de los cortes con sucesivos pases con alcohol en concentraciones decrecientes (100%, 96% y 70%). Después, se realizó el pretratamiento de las secciones con el buffer Target Retrieval pH 6 1X (Dako, Glostrup, Denmark) en olla a presión durante 3 minutos, los portaobjetos se atemperaron en buffer pre-hibridación SSC 2X durante 2 minutos. A continuación se incubaron con proteinasa K (PK) a 37°C durante 10 minutos y se eliminaron los restos de PK con varios lavados en buffer pre-hibridación SSC 2X, se realizaron pases sucesivos en alcohol en concentraciones crecientes (70%, 96% y 100%) para deshidratar el tejido. Finalmente, se añadió la sonda FISH correspondiente y se hibridó en el equipo Hybridizer (Dako, Glostrup, Denmark) 5 minutos a 80°C y toda la noche a 37°C. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado de astringencia, para eliminar los restos de sonda, en SSC 2X 0,3% de NP-40 2 minutos a 76°C, y los portaobjetos se montaron con DAPI.

Tabla 10. Listado de las sondas de hibridación fluorescente empleadas en este trabajo.

Sonda FISH	Referencia	Casa comercial	Locus	Fluoróforo
PathVysion HER-2 ADN Probe Kit II	06N46-030	Abbott molecular	HER2 , 17q11.2-12 CEP17, 17p11.1-q11.1	SpectrumOrange SpectrumGreen
Vysis LSI MYC Break Apart Rearrangement Probe Kit	01N63-020	Abbott molecular	8q24.12-q24.13	Spectrum Orange
PDP1 FISH Probe (20 Test Kit)	PDP1-20-OR	Empire Genomics	8q22.1	Green 5-Fluorescein dUTP

La visualización de la hibridación se realizó mediante microscopia de fluorescencia con el microscopio Leica DM5500B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) y un sistema de procesamiento de imágenes software Cytovision (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). La valoración de la FISH de HER2 se realizó contando el número de señales rojas por núcleo correspondientes al gen HER2 y el número de señales verdes por núcleo correspondientes al centrómero del cromosoma 17 (CEP17), en aproximadamente 20 núcleos no solapados. De acuerdo a los criterios establecidos por ASCO-CAP [29] se consideró amplificación de HER2 la presencia de un ratio $HER2/CEP17 \geq 2$ o ratio $HER2/CEP17 < 2$ y media de señales $HER2/núcleo \geq 6$. Para la valoración de la amplificación de MYC y PDP-1 no existen criterios establecidos que definan el punto de corte de positividad. En ambos casos ninguna de estas sondas presenta marcaje de centrómero por lo que únicamente se valoró, en ambos casos, el número de señales rojas por núcleo en aproximadamente 50 núcleos no solapados. Asumiendo que en condiciones normales existen dos copias de un gen, correspondiente a dos señales rojas por núcleo, se consideró amplificación MYC y PDP-1 cuando la media de señales por núcleo fue $>2,5$.

3.13. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Esta técnica se basa en la detección de un antígeno inmovilizado en fase sólida mediante el uso de anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción colorimétrica medible por espectrofotometría. Permite valorar los niveles de una proteína tanto en extractos, sobrenadantes de cultivos celulares, plasma, suero u orina.

En este trabajo se empleó el Quantikine ELISA Human CCL5/RANTES Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN) para la detección de CCL5 en sobrenadante de cultivos celulares, extractos de proteínas y suero de muestras de pacientes con cáncer de mama. Se trata de un ensayo ELISA cuantitativo tipo sándwich colorimétrico que presenta el anticuerpo monoclonal anti-CCL5 inmovilizado los pocillos de una placa de 96 pocillos. La determinación de los niveles de CCL5 mediante esta técnica se realizó en sobrenadantes de cultivos celulares de BCCLs, extractos de proteínas de las células en cultivo y en muestras de suero de pacientes con cáncer de mama. Los extractos de proteína se obtuvieron de acuerdo al protocolo indicado en el apartado 3.9; los sobrenadantes se recogieron de las células en cultivos y fueron centrifugados a $1000 \times g$ 2 minutos para eliminar restos celulares; las muestras de suero se obtuvieron a partir de

muestras de sangre total, tras centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos, después de la formación del coágulo. Todas las muestras se almacenaron a -20C° hasta su procesamiento. Se preparó la recta patrón con concentraciones conocidas de CCL5 y los reactivos necesarios para la realización del ensayo. Se añadió 100 µl de Assay Diluent RD1W a cada pocillo más 100 µl de recta patrón o de muestras por pocillo incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero se prepararon a una dilución de 1:100 en Calibrator Diluent RD6-11 diluido 1:5 en agua destilada, los sobrenadantes se prepararon a una dilución de 1:2, 1:10 y 1:50 en Calibrator Diluent RD6-11 diluido 1:5 en agua destilada y los extractos se prepararon a una concentración de 0,2 µg/µl en Calibrator Diluent RD6-11 diluido 1:5 en agua destilada. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Transcurridas las 2 horas incubación, todos los pocillos con se lavaron dos veces con 400 µl de Wash Buffer y se incubaron durante 1 hora con 200 µl de RANTES Conjugate a temperatura ambiente. Después de volver a lavar los pocillos se incubaron con 200 µl de Substrate Solution durante 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. La reacción se detuvo con 50 µl Stop Solution, observándose un viraje de color azul a color amarillo, dentro de los 30 minutos posteriores se mide la absorbancia a 450 nm en el lector de microplacas Sunrise (Tecan). Interpolando el valor absorbancia de cada muestra en la recta patrón se obtuvo la concentración de CCL5 en pg/ml en las muestras estudiadas.

4. Muestras de pacientes de cáncer de mama

Se obtuvieron 203 casos de cáncer de mama HER2 positivos con seguimiento medio de 17 años, cedidas por el Biobanco Fundación Jiménez Díaz de Madrid y el Biobanco del Hospital de Mar de Barcelona, cumpliendo con la legislación vigente establecida, *Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica*, y el *Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica*.

En todos los casos se dispuso de muestras representativas del componente tumoral infiltrante fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded). La selección de las muestras se llevó a cabo teniendo en cuenta los siguientes criterios: muestras de cáncer de mama infiltrante HER2 positivos, de cualquier estadio. Las muestras se agruparon de acuerdo al estadio de la enfermedad, en enfermedad precoz o localmente avanzada y en enfermedad metastásica. Además, las muestras de enfermedad precoz o localmente avanzada

se sub-clasificaron en base al esquema de tratamiento con trastuzumab, en neoadyuvancia y adyuvancia. Finalmente se obtuvieron tres grupos, muestras de neoadyuvancia, muestras de adyuvancia y muestras metastásicas, seleccionando en todos los casos muestras previas al tratamiento con trastuzumab. También, se seleccionaron muestras obtenidas después del tratamiento con trastuzumab (post-tratamiento) en los casos del grupo neoadyuvancia y muestras de recaída o progresión de la enfermedad después del tratamiento con trastuzumab en los grupos de adyuvancia, neoadyuvancia y metástasis. De todos los casos se recogieron los datos clínicos y su información clínico-patológica. La clasificación TNM (Tumor, Node, Metastasis) se realizó de acuerdo a lo establecido por el American Joint Committee on Cancer (AJCC) [15]. El grado histológico se definió de acuerdo con Scarff-Bloom-Richardson modificado mediante el criterio de Elston [10]. Los receptores de estrógenos (ER), de progesterona (PR) y la sobreexpresión de HER2 se determinaron mediante inmunohistoquímica. La amplificación de HER2 se confirmó mediante Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) y se evaluó siguiendo los criterios establecidos por la guía ASCO-CAP [29].

Las muestras de neoadyuvancia se clasificaron de acuerdo a la valoración de la respuesta patológica empleando el sistema de Miller & Payne [163] (Tabla 13), y en base a la respuesta ganglionar de Miller & Payne adaptada por Smith (Tabla 14).

Tabla 11. Valoración de la respuesta patológica mediante el sistema Miller & Payne [163]

Grado de respuesta	Descripción
G1	Mínimos cambios celulares, sin evidencia de reducción significativa de componente tumoral infiltrante.
G2	Reducción discreta de la componente tumoral infiltrante; pérdida de < 30% de masa tumoral.
G3	Reducción marcada del componente tumoral infiltrante entre el 30-90% de masa tumoral.
G4	Marcada desaparición del tumor infiltrante, únicamente detectando pequeños grupos celulares de tumor infiltrante o células tumorales aisladas; pérdida de más del 90% de la masa tumoral.
G5	No evidencia de tumor infiltrante residual. Puede existir presencia de carcinoma in situ.

Tabla 12. Valoración de la respuesta patológica ganglionar mediante el sistema Miller & Payne; adaptado por Smith [163]

Grado de respuesta	Descripción
A	Ganglios linfáticos negativos
B	Ganglios linfáticos con metástasis, sin cambios post tratamiento
C	Ganglios linfáticos con metástasis, con evidencia de respuesta parcial
D	Ganglios linfáticos con cambios secundarios a respuesta sin infiltración neoplásica residual

En base a esta clasificación se obtienen tres grupos de respuesta: 1) respuesta patológica completa (RpC) cuando no existe evidencia de la enfermedad ni en mama ni en axila, correspondiente a grado de respuesta G5 y respuesta ganglionar A o D; 2) respuesta parcial (RP), existiendo una respuesta completa en la mama y tumor residual en axila (G5-C), tumor mínimo residual en la mama y respuesta completa en axila (G4-D) o detección de tumor mínimo residual en mama y axila (G4-C); 3) no respuesta patológica (NRpC) cuando se detecta componente tumoral en mama y axila, correspondiente a grado de respuesta G1, G2 o G3 y respuesta ganglionar B o C.

De la serie de XX casos seleccionados se construyeron microarrays de tejido (TMA, Tissue Micro-Array). Se determinaron las áreas representativas por medio secciones de hematoxilina-eosina (H&E) de la zona tumoral y se tomaron tres *cores* de 1mm de diámetro de cada caso. Las secciones extraídas fueron colocadas en un nuevo bloque de parafina por medio equipo Tissue Arrayer (T1000, Chemicon) [164].

Además, se seleccionaron 17 casos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivos, del Biobanco del Hospital del Mar, de los que se dispone de muestra de suero previa al tratamiento con trastuzumab, junto con información clínica relevante.

5. Modelo murino de cáncer de mama HER2 +

Para la validación de algunos resultados obtenidos in vitro en líneas celulares, se realizó un modelo animal subcutáneo de cáncer de mama, en colaboración con el grupo de Investigación de Terapia Molecular del Cáncer del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (Barcelona). Todos el proceso del modelo animal fue controlado de acuerdo a la Directiva Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos,

siguiendo las guías University of British Columbia, las directrices de Canadian Council of Animal Care, con la aprobación del comité institucional de experimentación animal del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (Barcelona).

Para la realización del modelo animal se seleccionaron hembras atímicas de 6 semanas de 20-25 gr de peso del fenotipo SCID-Beige, doble inmunodeficiencia severa. Se realizó xenoinjerto ortotópico en un total 20 ratones, inoculando subcutáneamente en el flanco derecho $2,5 \times 10^6$ células de las líneas BT-474 y en el flanco izquierdo 2.5 millones de la línea BT-474.R, previamente preparadas en condiciones de esterilidad con matrigel (BD Biosciences) 1:1 en PBS. Desde la inoculación se realizaron dos mediciones semanales del volumen tumoral, empleando la fórmula $V = (A \times B^2)/2$, donde A y B representan la longitud y ancho del tumor, respectivamente. Cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor de 100 mm^3 , los ratones fueron randomizados en dos grupos de tratamiento, incluyendo 10 ratones por grupo. El grupo A (grupo control) fue tratado con 10 mg/kg IgG1κ (Sigma-Aldrich) en solución salina mediante administración intraperitoneal y el grupo B (grupo de tratamiento) fue tratado con 10 mg/kg de trastuzumab en solución salina mediante administración intraperitoneal. Los tratamientos se realizaron dos veces por semana. El tratamiento se prolongó durante 8 semanas midiendo el volumen tumoral dos veces por semanas. Completado el tiempo de tratamiento los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. De todos los ratones se extrajo el tumor subcutáneo generado, así como el hígado y los pulmones, fijándose en formol entre 12 y 24 horas e incluyéndose en parafina. En los tumores se determinó la expresión de las proteínas p-histona H3 y caspasa 3 truncada mediante inmunohistoquímica.

6. Estadística

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS versión 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). El estudio estadístico de las diferencias entre las condiciones experimentales tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo* se realizó mediante la prueba T-Student para muestras pareadas. En todos los análisis realizados se aplicó un nivel de significancia de p-valor < 0,05.

La determinación del punto de corte óptimo basado en el punto final de progresión para la expresión de CCL5 mediante inmunohistoquímica y la concentración de CCL5 mediante ensayo ELISA, se realizó mediante la curva de la característica operativa del receptor o *curva ROC*.

Para analizar correlaciones entre la expresión de CCL5 y las variables clínico-patológicas se empleó el test de la χ^2 (test exacto de Fisher). La supervivencia global (SG) se definió como el tiempo transcurrido de la fecha de la cirugía a la fecha de muerte por cualquier causa o hasta la

última fecha que la paciente, si aún sobrevivía, fue evaluada en el centro médico. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) se evaluó desde la fecha de la cirugía a la fecha de la aparición de cualquier recurrencia primaria, regional o a distancia, así como la aparición de una segunda neoplasia. La supervivencia libre de progresión (SLP) se define como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta progresión de la enfermedad o muerte por cualquier causa, o pérdida de seguimiento. El análisis de supervivencia se realizó por el método de Kaplan-Meier y las diferencias fueron evaluadas con el test de *Log-rank* de igualdad a lo largo de los datos. Aquellos factores pronóstico que en el análisis univariado fueron significativos con valores de p menores que 0,1, se incluyeron en el análisis multivariado de supervivencia basado en el modelo de riesgo proporcional de Cox. Todos los test estadísticos fueron de 2 colas y a un nivel de significancia p-valor < 0,05.

Resultados

1. Caracterización de líneas celulares y medida del efecto de trastuzumab

1.1 Selección de la concentración de TZM

La administración de trastuzumab se realiza en combinación con quimioterapia a una dosis entre 2 y 8 mg/kg [165–168]. Este rango de dosis de tratamiento provoca que la concentración en suero del fármaco oscila entre 10-20 $\mu\text{g/ml}$ [169,170], de acuerdo a este dato y en base a los estudios preclínicos del fármaco con líneas celulares de cáncer de mama [171,172] se estableció para el desarrollo de este trabajo una concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$.

1.2 Evaluación de la sensibilidad a trastuzumab en líneas de cáncer de mama HER2 +

Se ha evaluado la sensibilidad a trastuzumab en el panel de 8 líneas de cáncer de mama HER2 positivas mediante ensayos de proliferación celular a 0, 3, 5 y 7 días, en presencia y ausencia de trastuzumab (Figuras 10 y 11). La proliferación celular es muy similar en todas las líneas celulares a la concentración establecida en los primeros 3 días de tratamiento. Sin embargo, a partir de los 5 días de tratamiento existe una disminución de la proliferación en alguna de las líneas testadas, especialmente en SK-BR-3 y EFM19-2A, siendo más acusada a los 7 días de exposición al trastuzumab en las líneas SK-BR-3, EFM19-2A, BT-474 y AU565 (Figura 10).

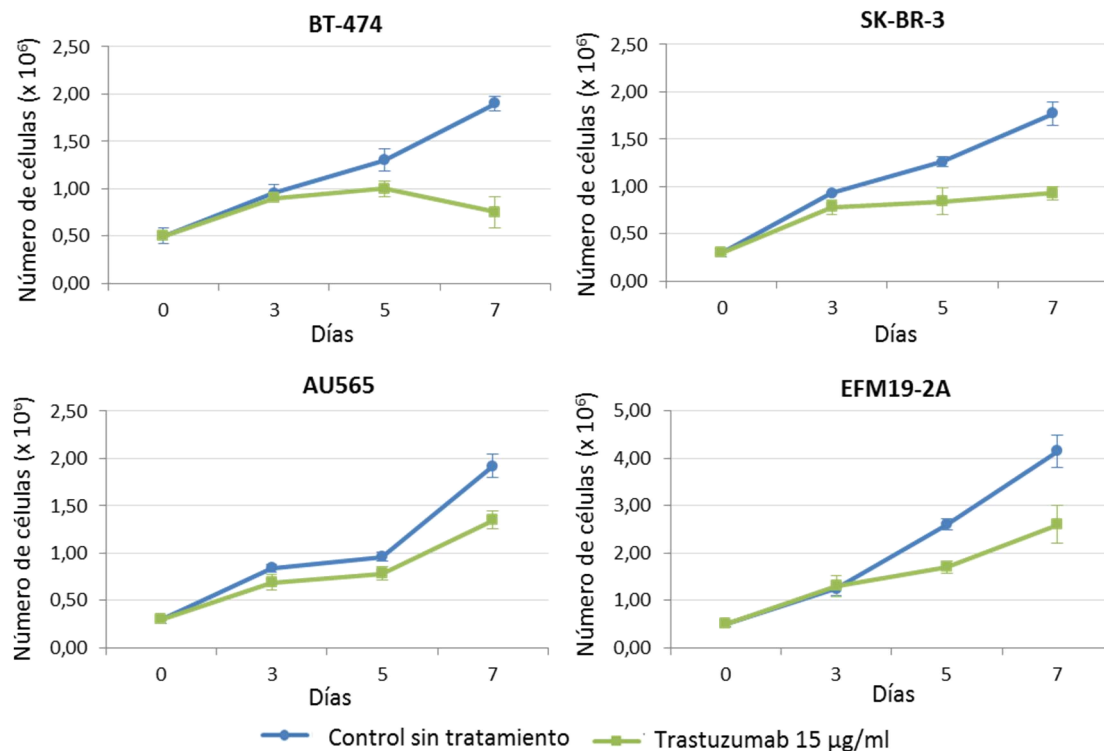


Figura 10. Gráficos de líneas que representan en número de células ($\times 10^6$) de las líneas de cáncer de mama HER2 positivas, BT-474, SK-BR-3, AU565 y EFM19-2 A, durante la exposición al tratamiento con trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$ durante 3, 5 y 7 días.

En las líneas HCC1419, HCC1569, HCC1954 y JIMT1 se observa una pequeña disminución de la proliferación celular únicamente a los 7 días de tratamiento (Figura 11).

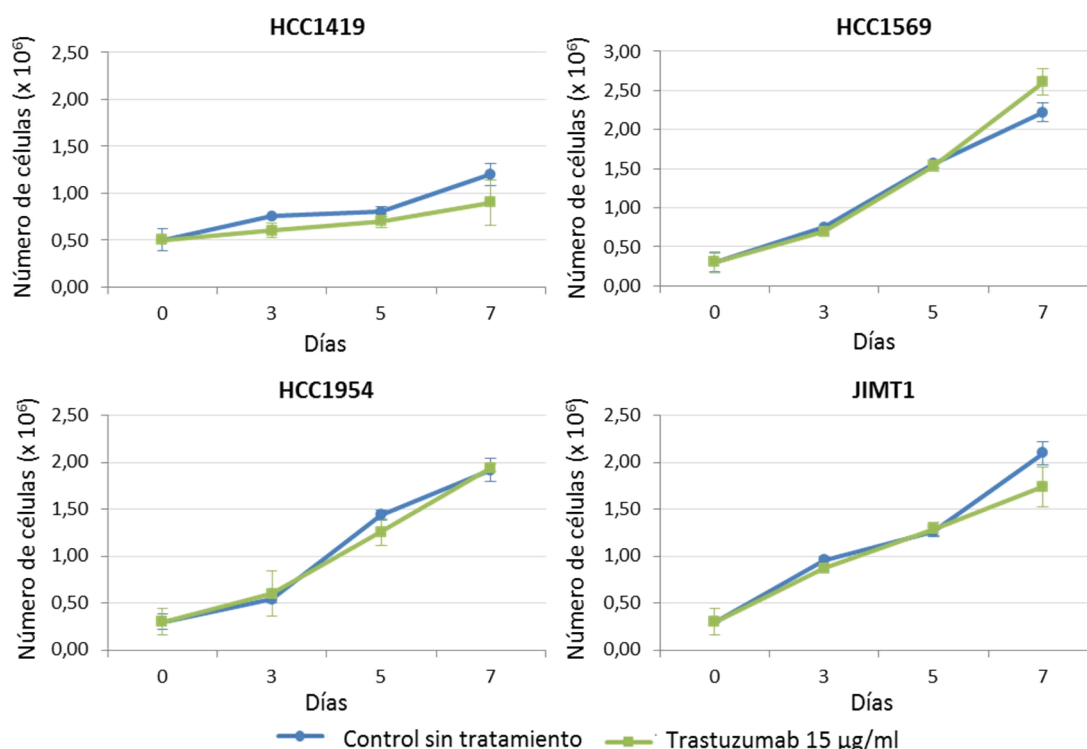


Figura 11. Gráficos de líneas que representan en número de células ($\times 10^6$) de las líneas de cáncer de mama HER2 positivas HCC1419, HCC1569, HCC1954 y JIMT1, durante el tratamiento con trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$ a 3, 5 y 7 días de exposición.

En base al algoritmo de O'Brien [153], las líneas AU565, SK-BR-3, BT-474 y EFM19-2A son consideradas sensibles a trastuzumab, con valores de ΔGR 1.26, 2.13, 1.73, y 3.52, respectivamente; todos ellos ≥ 1.2 , y con porcentajes de disminución de la proliferación respecto a la condición de tratamiento superiores al 20%. Mientras que las líneas HCC-1954, HCC-1569 y JIMT-1 presentan resistencia al tratamiento con trastuzumab, con valores de $\Delta\text{GR} \leq 1.2$ y un porcentaje de disminución de la proliferación inferior al 20% en todos los casos (tabla 13, Figura 12). La línea HCC1419 presenta un valor de ΔGR de 1.23, por lo que según este criterio debería de ser considerada sensible al tratamiento con trastuzumab; sin embargo, presenta un porcentaje de disminución de la proliferación del 16,04%, y por este criterio sería considerada resistente al tratamiento con trastuzumab. Ante este resultado, se puede considerar que esta línea presenta una resistencia intermedia a trastuzumab.

	Control sin tratamiento		Trastuzumab 15 µg/ml		% de disminución de proliferación	Ratio de proliferación (ΔGR)
	nº células	% respecto al control	nº células	% respecto al control		
AU565	1,92	100%	1,39	72,19%	27,81%	1,26
SK-BR-3	1,77	100%	0,90	50,68%	49,32%	2,13
EFM19-2A	4,15	100%	2,50	60,12%	39,88%	1,73
BT-474	1,90	100%	0,74	38,68%	61,32%	3,52
HCC1419	1,20	100%	1,01	83,96%	16,04%	1,23
HCC1596	2,22	100%	2,61	117,57%	-17,57%	0,94
HCC1954	1,92	100%	1,94	101,25%	-1,25%	0,82
JIMT1	2,10	100%	1,84	87,61%	17,14%	1,11

Tabla 13. Valores del ratio de proliferación celular (ΔGR) en las 8 líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas. Las células se clasificaron como sensibles (S) o resistentes (R) mediante la determinación de la proliferación celular en presencia y ausencia de 15 µg/ml trastuzumab durante 7 días. En todos los casos, la resistencia se definió como una respuesta de $\leq 1,2$ en la tasa de crecimiento.

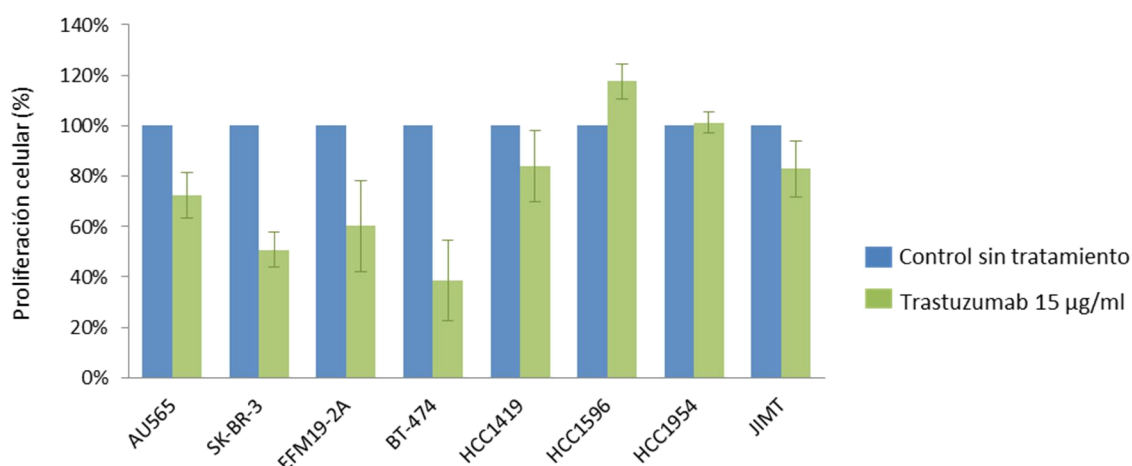


Figura 12. Determinación de sensibilidad a trastuzumab en 8 líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas. La determinación de la sensibilidad a trastuzumab se realizó mediante ensayos de proliferación celular en presencia y ausencia de 15 µg/ml a 7 días.

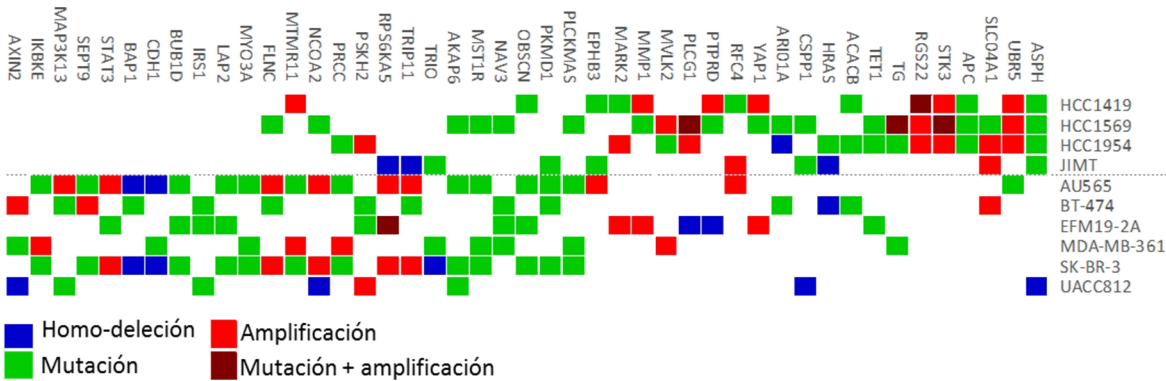
2. Resistencia primaria a trastuzumab

El análisis de alteraciones en el número de copias (amplificaciones o deleciones) y las mutaciones descritas de las líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas obtenidos del repositorio *Cancer Cell Encyclopedia* permitió [173] analizar las diferencias significativamente distintas existentes entre las líneas con resistencia primaria y las líneas sensibles a trastuzumab, e identificar posibles mecanismos asociados a dicha resistencia. Agrupando las líneas resistentes primarias, HCC1419, HCC1569, HCC1954 y JIMT, y las líneas sensibles, AU565, BT-474, EFM19-

2A, SK-BR-3, también se incluyeron las líneas MDA-MB-361 y UACC-812, líneas de cáncer de mama HER2 positivas con expresión de receptores de estrógenos y progesterona.

En un primer análisis, se identificaron aquellos genes que presentaban deleciones, mutaciones, amplificaciones o mutaciones más amplificaciones entre el grupo de líneas resistentes y líneas sensibles, identificándose 45 genes alterados (Figura 13 A). En el grupo de células con resistencia primaria a trastuzumab, se observó que presentaban mutaciones en los genes ASPH y APC, y amplificación de los genes UBR5, STK3 y RGS22. En un segundo análisis, se estudiaron únicamente las alteraciones en número de copias, identificando los genes con delección, ganancia de una copia o amplificación, entre ambos grupos de líneas celulares, encontrándose 20 genes diferencialmente alterados (Figura 13 B). En el grupo de líneas con resistencia primaria se encontró un grupo de 4 genes, PDP1, TOX2, SNAI2 y C8orf4, con amplificación respecto al grupo de las líneas sensibles.

A Alteraciones genómicas (mutaciones + CNAs)



B CNAs de genes up-regulados

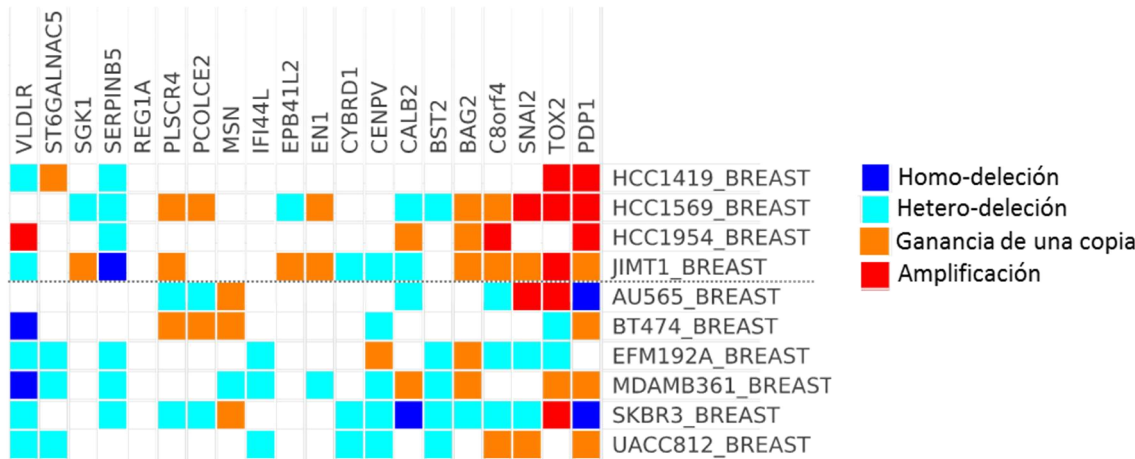


Figura 13. Array comparativo entre los grupos de líneas celulares de cáncer de mama HER2 + resistentes primarias, y sensibles a trastuzumab. **A)** Array de las alteraciones genómicas. Se identifican 45 genes diferencialmente alterados en el grupo de resistencia primaria respecto a las sensibles a trastuzumab. **B)** Array de las alteraciones del número de copias. Se identifican 20 genes diferencialmente alterados entre el grupo de resistentes a trastuzumab respecto a las sensibles a trastuzumab.

Analizado los genes identificados que presentaban amplificación en las líneas con resistencia primaria se verificó que 6 de estos genes se localizaban en el cromosoma 8, concretamente en el brazo largo del cromosoma y en el brazo corto próximo a la zona centromérica: UBR5 (8q22.3), RGS22 (8q22.2), STK3 (8q22.2), PDP1 (8q22.1), SNAI2 (8q11.21) y C8orf4 (8p11.21), por lo que estos resultados sugieren que en las líneas resistentes primarias a trastuzumab existe una ganancia de la región centromérica y del brazo largo del cromosoma 8. En base a estos resultados, se analizaron los genes presentes en la región 8q y 8p, identificando localizados en esta región a los genes MYC (8q 24.21), CCNE2 (8q22.1) y FGFR1 (8p 11.23), con relevancia en cáncer de mama (Figura 14).

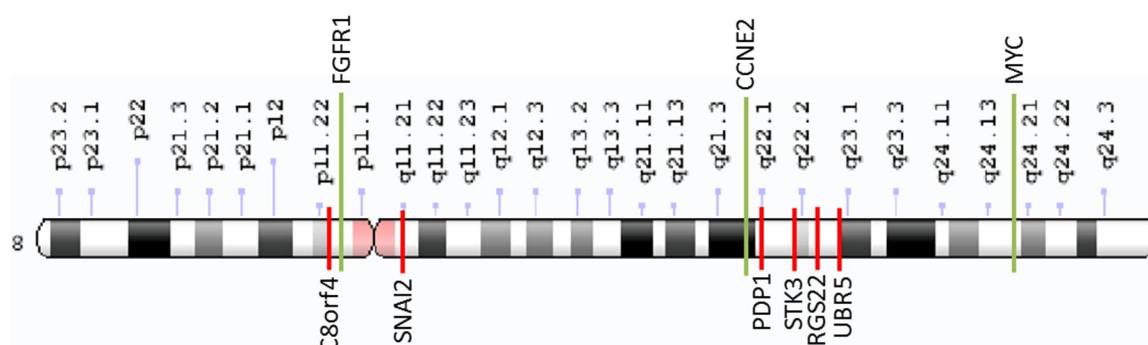


Figura 14. Representación gráfica del cromosoma 8. En rojo se indica la localización de los genes UBR5 (8q22.3), RGS22 (8q22.2), STK3 (8q22.2), PDP1 (8q22.1), SNAI2 (8q11.21) y C8orf4 (8p 11.21) que presentan amplificación en las líneas celulares de cáncer de mama con resistencia primaria a trastuzumab. En azul se indica la localización de tres genes cercanos a la región amplificada con relevancia en cáncer de mama.

La validación de la amplificación de la región 8q en el grupo de las líneas resistentes frente a las sensibles a trastuzumab, se realizó mediante FISH. Se seleccionó el gen PDP-1 obtenido en el array y además, se incluyó el gen MYC.

Línea celular	Media señales MYC	Media señales PDP1
BT-474	5,5	3,8
SK-BR-3	16	2,3
AU565	12,75	2,84
EFM19-2A	17	2,89
HCC1419	35,3	14
HCC1569	31,47	24,5
HCC1954	29	18,4
JIMT	22	11,4

Tabla 14. Media del número de señales detectado en la valoración mediante FISH para los genes PDP1 y MYC en las líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas sensibles y resistentes a trastuzumab.

En las líneas resistentes primarias, HCC1569, HCC1954 y JIMT1, se confirmó un aumento del número de señales correspondientes a PDP1 y MYC (Figura 15). En las líneas sensibles a trastuzumab analizadas, BT-474, SK-BR-3, AU565 y EFM19-2A se detectó una dotación normal del gen PDP1 en todas las líneas, junto a un incremento del número de señales del gen MYC, siendo superior a la dotación génica normal pero inferior a la media de copias detectada en las líneas resistentes primarias (Figura 15). Estos resultados confirman que no existe amplificación de PDP1 en las células sensibles, pero, sin embargo, ponen de manifiesto que existe amplificación de MYC tanto en células sensibles como resistentes primarias a trastuzumab.

La ganancia del gen MYC en líneas celulares se ha definido como un fenómeno frecuente debido principalmente a la implicación de este gen en el proceso de immortalización celular de las líneas celulares en cultivo [174,175].

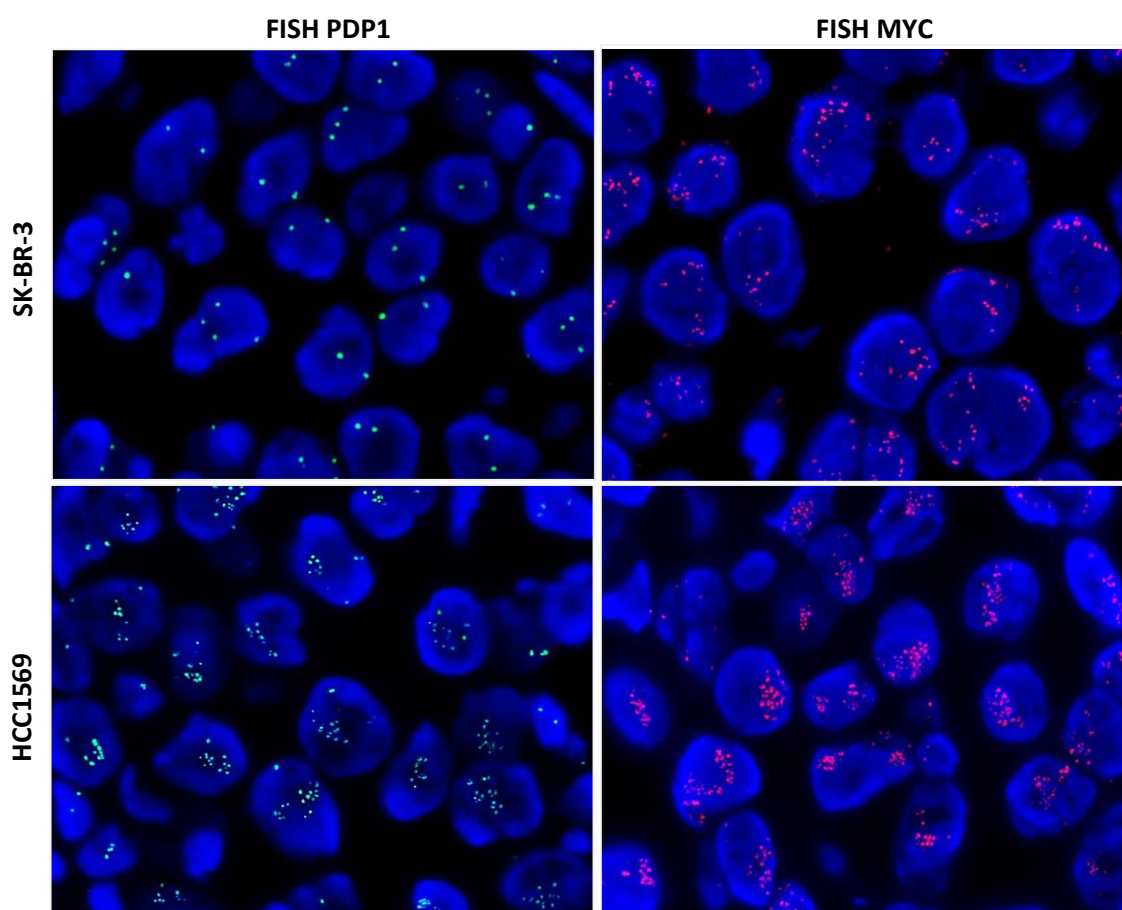


Figura 15. Imágenes representativas 1000X con objetivo inmersión de FISH de las señales de fluorescencia correspondientes a los genes PDP1 (8q22.1) *Green 5-Fluorescein dUTP* y MYC (8q24.12-q24.13) *Spectrum Orange* mediante microscopia de fluorescencia con objetivo de inmersión, contraintinción con DAPI. SK-BR-3 presenta una media de 2,3 señales del gen PDP1 y una media de 16 señales correspondientes al gen MYC. Las células HCC1569 presentan una media de 24,5 señales de PDP1 y una media de 31,47 señales del gen MYC.

La implicación de la ganancia de la región cromosómica 8p11.21-8q22.3 en la resistencia primaria a trastuzumab observada en el estudio diferencial de CNAs en las líneas de cáncer de mama HER2 positivas se analizó en una cohorte de 42 muestras de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz HER2 positivo, en esquema de tratamiento de neoadyuvancia que incluye trastuzumab.

Se consideró amplificación de PDP1 la detección de ≥ 3 de media de señales del gen, en cualquier porcentaje del componente tumoral. En el caso de la valoración de MYC, se consideró amplificación del gen la presencia de ≥ 5 copias de acuerdo a lo descrito en la literatura [176,177] (Figura 16).

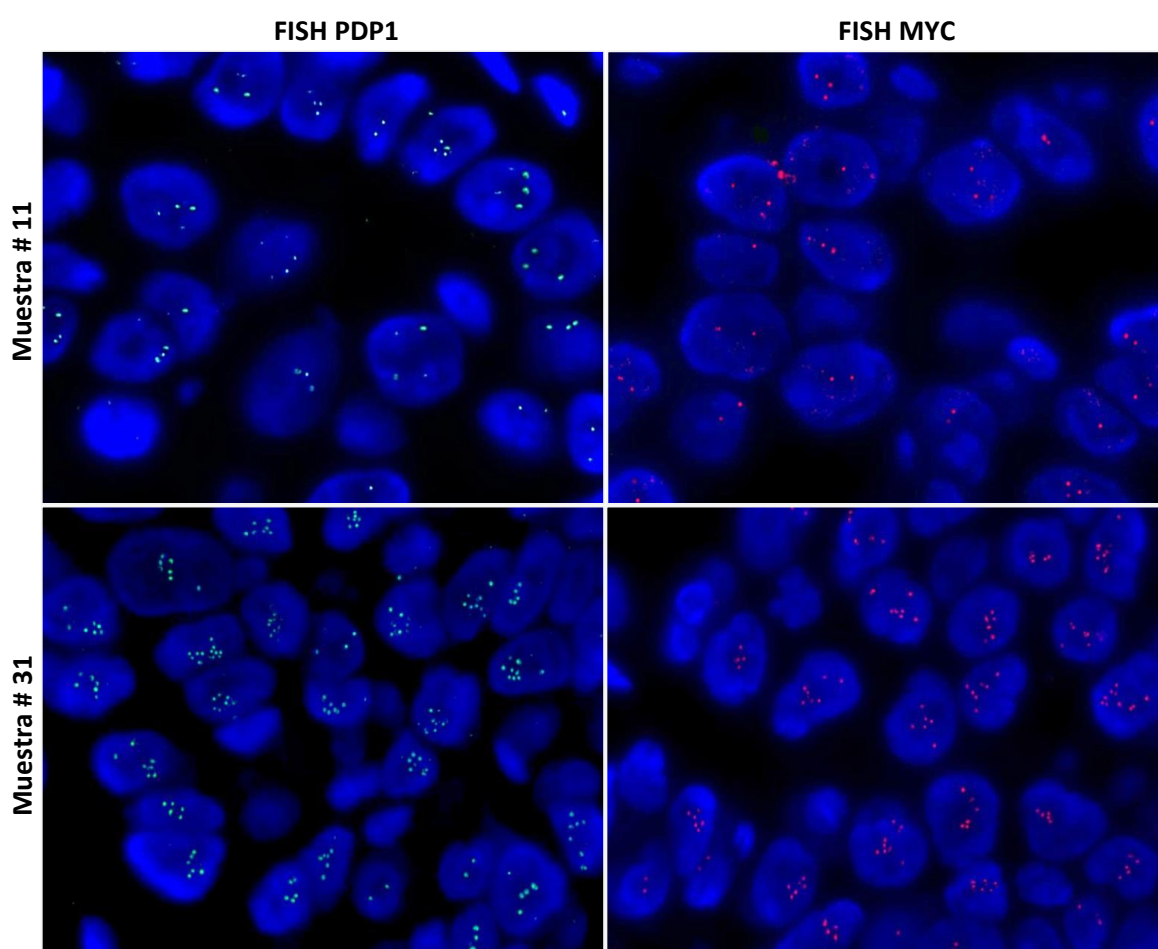


Figura 16. Imágenes representativas 1000X con objetivo inmersión de FISH de las señales de fluorescencia correspondientes a los genes PDP1 (8q22.1) *Green 5-Fluorescein dUTP* y MYC (8q24.12-q24.13) *Spectrum Orange* mediante microscopia de fluorescencia con objetivo de inmersión en secciones histológicas de cáncer de mama HER2 positivas previas al tratamiento con trastuzumab. La muestra #11 presenta un media de 2,89 señales de PDP1 y una media de 2,35 señales de MYC. La muestra #31 presenta un media de 9,43 señales PDP1 y una media de 9,62 señales de MYC.

La amplificación de PDP1 y MYC se correlacionó de forma significativa con una menor tasa de respuestas patológicas completas al tratamiento con trastuzumab (p-valor =0,019 y p-valor = 0,024 respectivamente. De total de los 42 casos analizados, el 61,9% (26/42) no presentaron respuesta patológica completa, observándose en un 85% (17/26) amplificación de PDP1 y en un 82,4% (14/26) amplificación de MYC, mientras que el restante 38,1% (16/42) de las muestras correspondió a casos con respuesta completa, detectándose únicamente amplificación de PDP1 y MYC en un 18,8% (3/16) (Tablas 15).

		Respuesta			χ ² p
		No respuesta patológica completa	Respuesta patológica completa	Total	
PDP1					0,019
No amplificado	N	9	13	22	
	% PDP1	40,9	59,1	100,0	
	% respuesta	34,6	81,3	66,7	
Amplificado	N	17	3	20	
	% PDP1	85,0	15,0	100,0	
	% respuesta	65,4	18,8	47,6	
Total	N	26	16	42	
	% PDP1	61,9	38,1	100,0	
	% respuesta	100	100	100,0	
MYC					0,024
No amplificado	N	12	13	25	
	% PDP1	48,0	52,0	100,0	
	% respuesta	46,2	81,3	59,5	
Amplificado	N	14	3	17	
	% PDP1	82,4	17,6	100,0	
	% respuesta	53,8	18,8	40,5	
Total	N	26	16	42	
	% PDP1	61,9	38,1	100,0	
	% respuesta	100,0	100,0	100,0	

Tabla 15. Distribución de la detección de amplificación de los genes PDP1 y MYC mediante FISH en la cohorte de muestras de pacientes de cáncer de mama precoz HER2 positivas, en relación a la respuesta patológica completa a trastuzumab.

3. Resistencia adquirida a trastuzumab

3.1 Generación de líneas de cáncer de mama HER2 positivas con resistencia secundaria a trastuzumab

De todas las líneas celulares de cáncer de mama definidas como sensibles a trastuzumab, AU565, SK-BR-3, BT-474 y EFM19-2A, se han generado tres poblaciones resistentes a

trastuzumab por línea, mediante la exposición continuada al fármaco durante un período variable de entre tres y ocho meses. Las células se han tratado de forma continuada a 15 µg/ml de trastuzumab. De forma paralela y simultánea se han cultivado las líneas parentales sin tratamiento, manteniendo su sensibilidad al fármaco y actuando como control del proceso de generación de resistencia. La resistencia se valoró mensualmente mediante la realización de ensayos de proliferación celular en presencia y ausencia de trastuzumab a una concentración de 15 µg/ml durante 7 días, aplicando el algoritmo de O'Brien [153].

Una vez confirmada la generación de resistencia se realizó una pausa del tratamiento con trastuzumab durante 30 días. Transcurrido este tiempo, se testó la resistencia mediante experimentos de conteo a 7 días, demostrando que todas las líneas generadas mantenían la resistencia a trastuzumab tras el tiempo de pausa.

De cada línea celular se seleccionó el pool que presentaba mayor porcentaje de crecimiento tras el tratamiento con trastuzumab durante 7 días (pool 3 de BT-474, pool 2 de AU565, pool 1 de SK-BR-3 y pool 1 de EFM19-2A). A partir de estos pools seleccionados se aislaron clones de cada una de las líneas mediante el método de dilución extrema, en presencia de trastuzumab 15 µg/ml. Una vez obtenidos los clones se testó la resistencia al fármaco mediante experimento de conteo a 7 días, evidenciando que todos los clones presentaban resistencia a trastuzumab (Figura 17), estas nuevas líneas celulares se denominaron BT-474.R, SK-BR-3.R, AU565.R, y EFM19-2A.R y se mantuvieron en cultivo en presencia de trastuzumab 15 µg/ml.

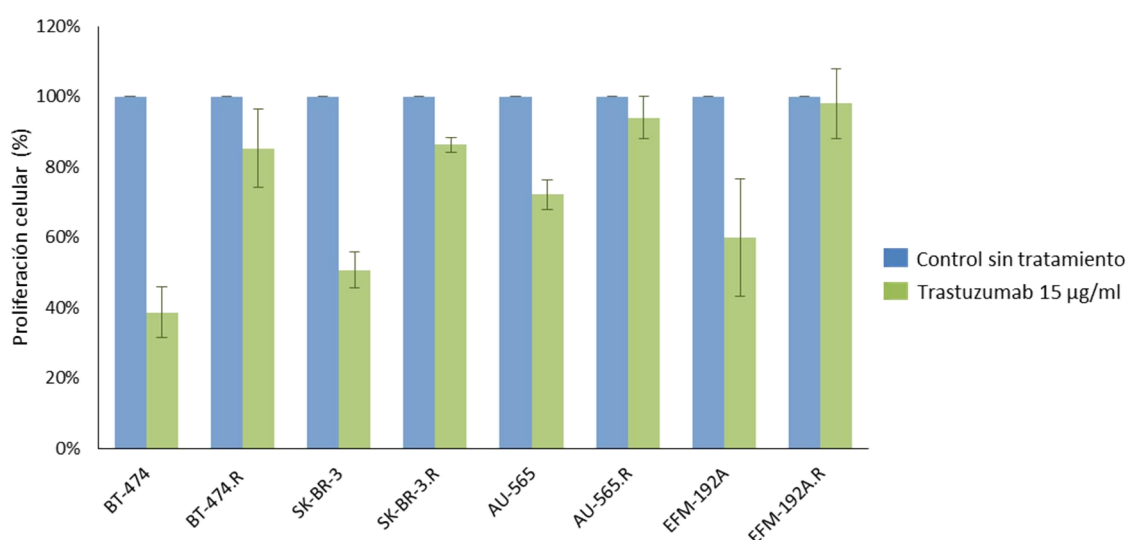


Figura 17. Valoración de la resistencia adquirida a trastuzumab en las líneas celulares BT474, SKBR3, AU565 y EFM192A, después del proceso de generación de pools, la pausa de tratamiento durante 1 mes y el aislamiento de clones: Recuento (media de un mínimo de 3 réplicas) del número de células a 7 días de tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml o en ausencia de tratamiento. En todas las líneas, las células

resistentes (.R) muestran un crecimiento en presencia del fármaco más elevado que el de las células sensibles en las mismas condiciones. Todos los clones mostraron una importante resistencia a trastuzumab, con valores de ΔGR inferiores al punto de corte: 1,14 en BT-474.R, 1,11 en SK-BR-3.R, 0,91 en AU565.R, y 0,85 en EFM19-2A.R. Además, los porcentajes de resistencia en las 4 líneas fueron superiores al 80% (Tabla 16).

	Control sin tratamiento	Trastuzumab $\mu g/ml$	15 % de disminución de proliferación	Ratio de proliferación (ΔGR)
BT-474	100%	38,70%	61,30%	3,52
BT-474.R	100%	85,31%	14,69%	1,14
SK-BR-3	100%	50,67%	49,33%	2,13
SK-BR-3.R	100%	86,25%	13,75%	1,11
AU-565	100%	72,15%	27,85%	1,26
AU-565.R	100%	93,96%	6,04%	0,91
EFM-192A	100%	60,00%	40,00%	1,73
EFM-192A.R	100%	98,00%	2,00%	0,85

Tabla 16. Valores del ratio de proliferación (ΔGR) y el porcentaje de decrecimiento en el número de colonias de líneas celulares parentales y su línea resistente a trastuzumab. En todos los casos se el valor del ratio de proliferación (ΔGR) en la líneas resistentes es inferior ≤ 1.2 y presentan una disminución de su crecimiento inferior el 20%. Las células se clasificaron como sensibles (S) a trastuzumab o resistentes (R) a trastuzumab.

Tras la generación de la resistencia a trastuzumab, se observó que no existían diferencias en la morfología y la dinámica de crecimiento de las células generadas respecto a su control sensible (Figuras 18 y 19).

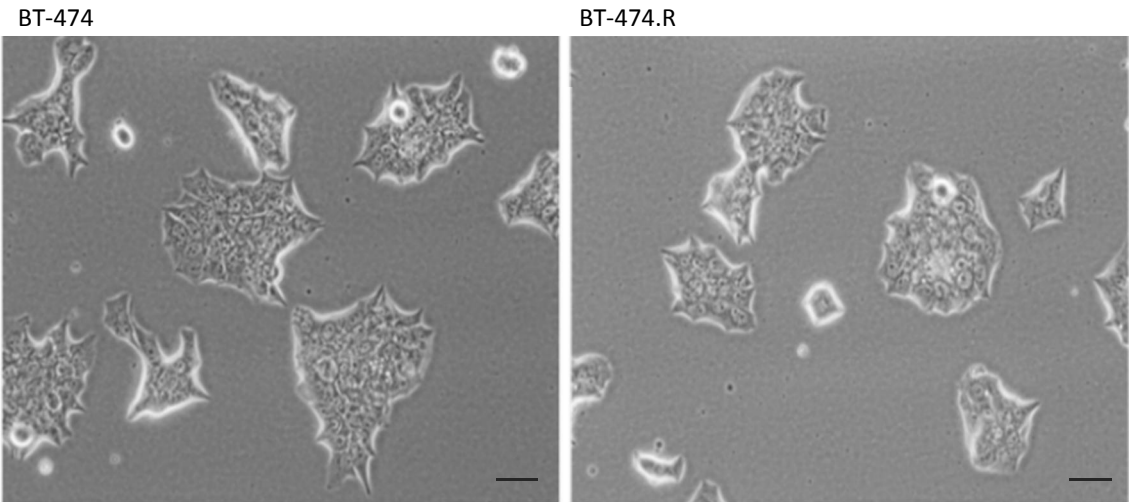


Figura 18. Imágenes representativas de contraste de fases de células sensibles BT-474 y con resistencia adquirida a trastuzumab BT-474.R cultivadas en monocapa (escala 200 nM).

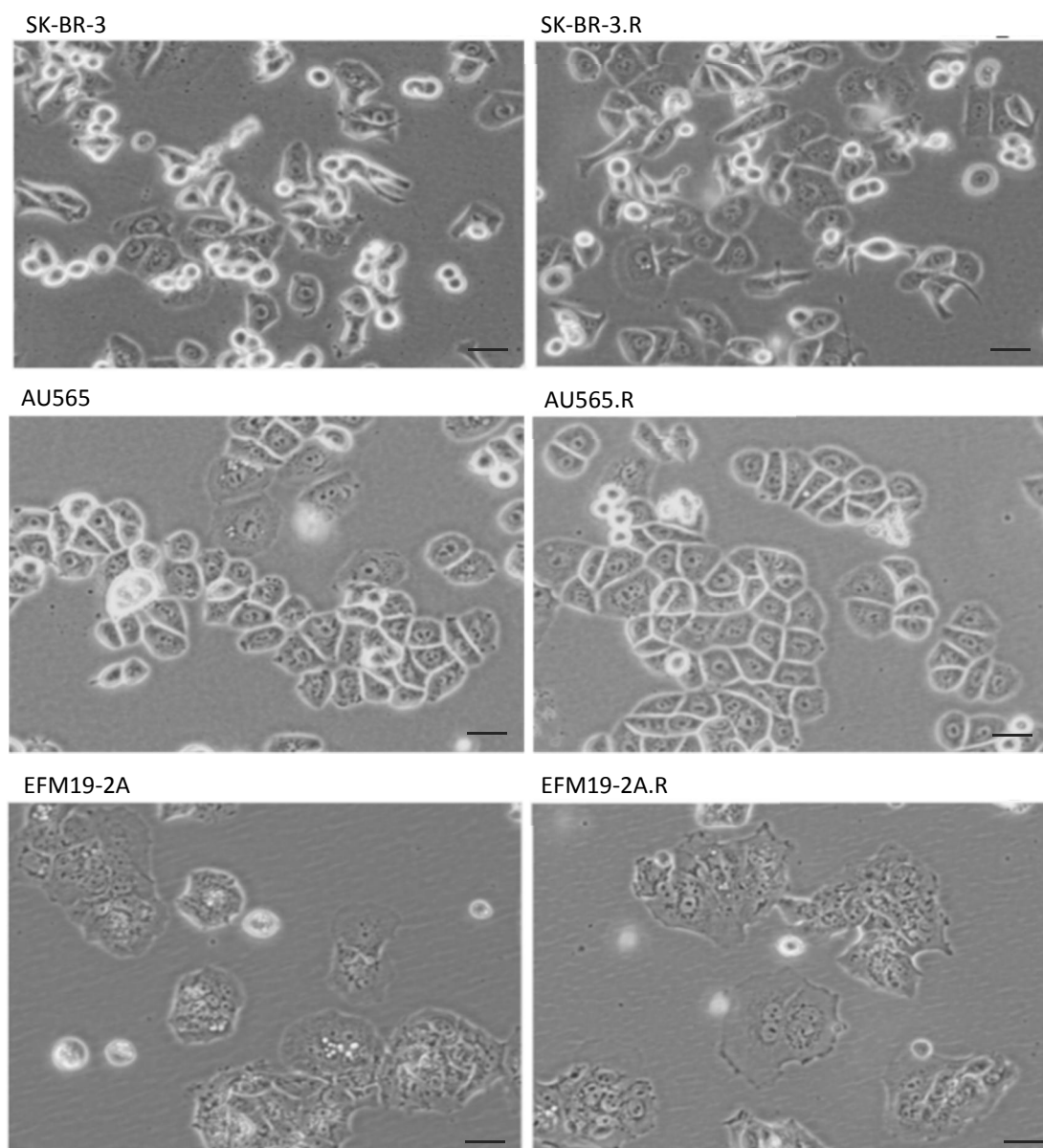


Figura 19. Imágenes representativas de contraste de fases de células sensibles (SK-BR-3, AU565, EFM19-2A) y con resistencia adquirida a trastuzumab (SK-BR-3.R, AU565.R, EFM19-2A.R) cultivadas en monocapa (escala 200 nM). No se observan diferencias en el patrón de crecimiento entre las líneas sensibles y con resistencia adquirida.

La valoración de la resistencia adquirida a trastuzumab generada se determinó también a mayor tiempo de exposición mediante ensayos clonogénicos en las líneas BT-474.R, SK-BR-3.R, AU565.R, y EFM19-2A.R, junto con sus correspondientes líneas parentales sensibles (Figura 20). Todas las líneas se sometieron a una exposición de trastuzumab 1 $\mu\text{g/ml}$, empleando como condición control la ausencia de tratamiento, durante 21 días. La valoración del ensayo se realizó midiendo el área crecimiento sobre la superficie de cultivo y el número de colonias formadas en cada línea, valorando el crecimiento de la condición de tratamiento frente a la condición control sin tratamiento.

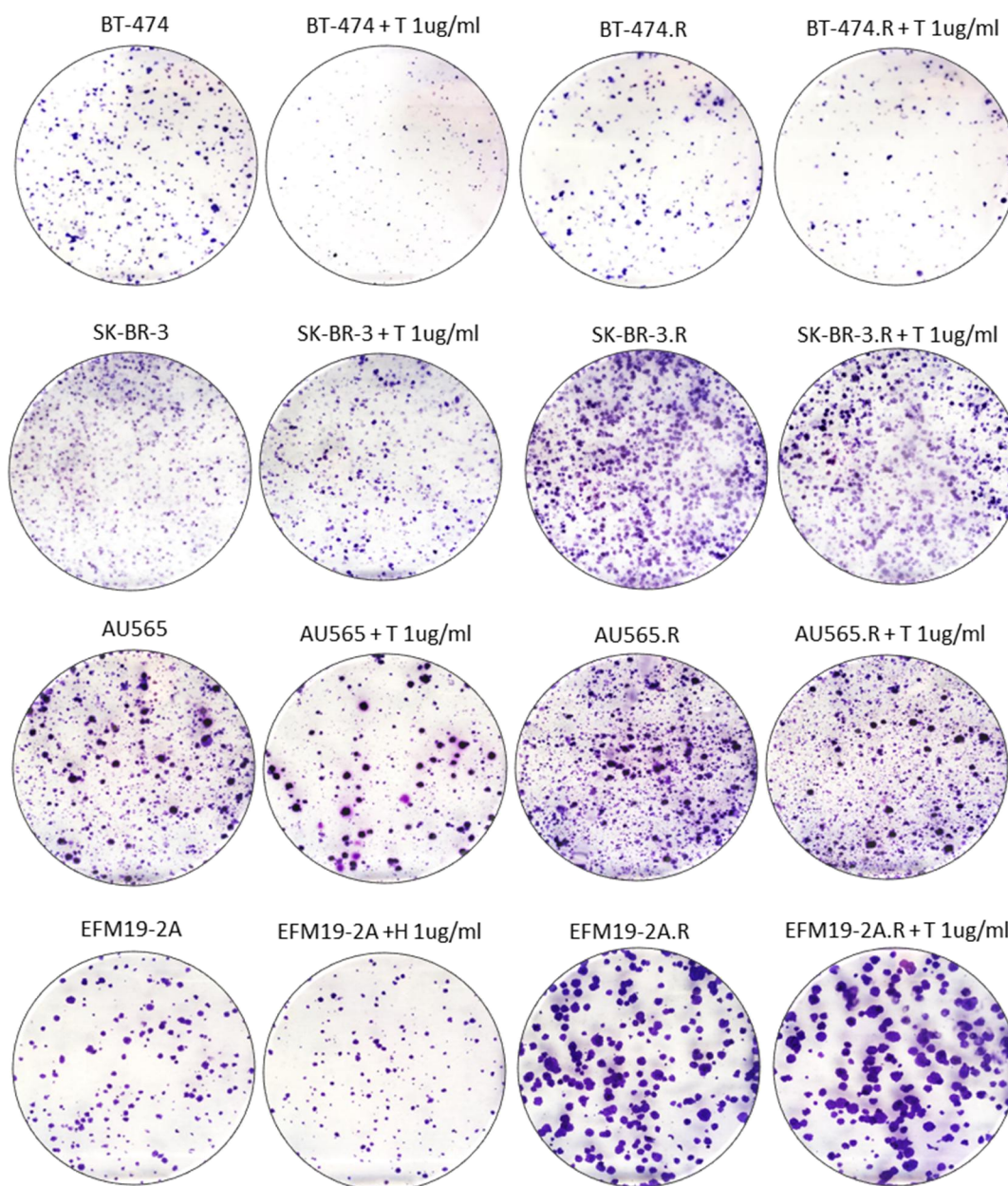


Figura 20. Ensayo clonogénico de células BT-474, BT-474.R, SK-BR-3, SK-BR-3.R, AU565, AU565.R, EFM19-2A y EFM19-2A.R, en condición control sin tratamiento y condición de tratamiento con trastuzumab 1 µg/ml durante 21 días. Las líneas celulares sensibles presentaron una inhibición en la formación de colonias en presencia del tratamiento. Las líneas de la resistencia adquirida a trastuzumab mostraron una formación de colonias similar a la observada en sus respectivos controles de tratamiento.

El tratamiento prologando de 21 días demostró que el tratamiento con trastuzumab provocó una destacada inhibición de la formación de colonias en las líneas sensibles BT-474, AU56 y EFM19-2A; siendo más moderado en la línea SK-BR-3. En la condición de tratamiento se observó una disminución del número de colonias y la superficie ocupada respecto a lo observado en la condición control. Sin embargo, el tratamiento a 21 días no evidenció una

inhibición significativa de la formación de colonias en las líneas con resistencia adquirida, observándose en todas ellas un número de colonias similar al de la condición control, demostrando que se trata de una resistencia estable.

Además, se realizó este ensayo clonogénico en las líneas resistentes primarias, HCC1569, HCC1954 y JIMT1 (Figura 21). En las líneas HCC1569, HCC1954 y JIMT1 no se observó ninguna diferencia en el área de crecimiento, ni en la formación de colonias entre la condición control y tratada.

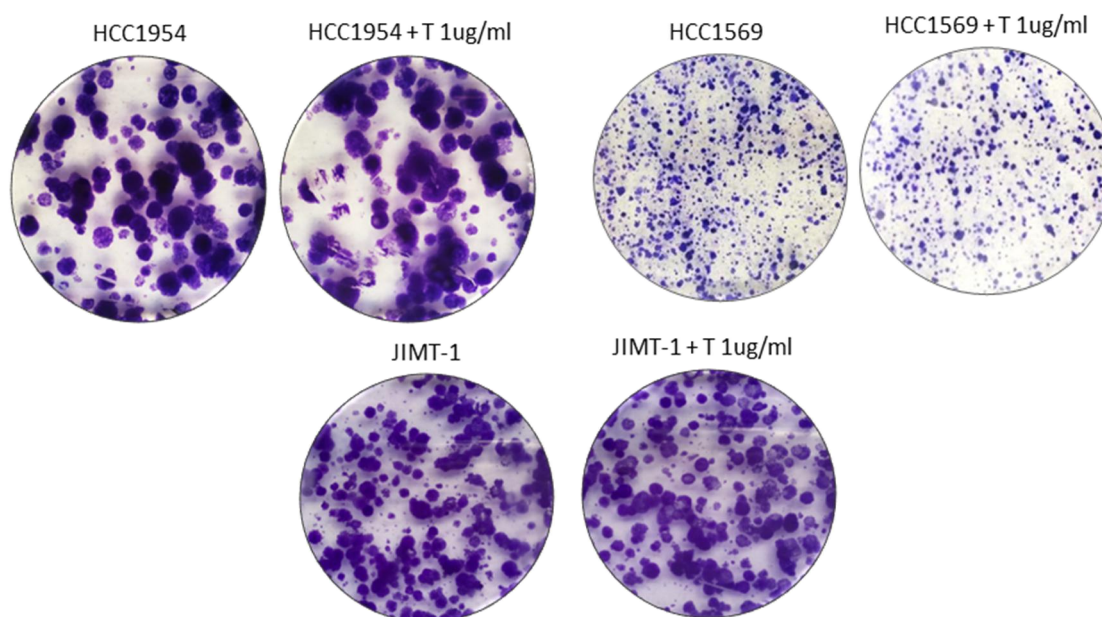


Figura 21. Ensayo clonogénico de células con resistencia primaria HCC1954, HCC1569, JIMT1, en condición control sin tratamiento y condición de tratamiento con trastuzumab 1 µg/ml durante 21 días. Las tres líneas presentaron el mismo crecimiento en presencia y ausencia del fármaco, lo que confirma la resistencia a trastuzumab en estas líneas.

3.2 Confirmación in vivo del modelo de cáncer de mama HER2 positivo resistente a trastuzumab

La valoración de la resistencia se confirmó en un modelo murino. Únicamente se realizó con las líneas celulares BT-474 y BT-474.R, con capacidad de tumorigenesis, a través de la inoculación en ratones SCID/beige. Un vez que los tumores alcanzaron el volumen adecuado, superior 100 mm³, se aleatorizaron en dos grupos de tratamiento, grupo control, tratado con 10 mg/kg IgG1k y grupo de tratamiento, tratado con 10 mg/kg de trastuzumab. De forma similar a los resultados obtenidos in vitro, el modelo resistente a trastuzumab presentó tasas de crecimiento tumoral significativamente mayores tras ser inoculadas en los ratones, respecto al modelo sensible. El grupo control presentó un crecimiento estable en los dos modelos a lo largo de las 3 semanas

de tratamiento. En el grupo de tratamiento con trastuzumab 10 mg/kg se observó una disminución progresiva, a partir de la segunda semana de tratamiento, de la tasa de crecimiento tumoral (19% respecto al 100% del día 0) en los tumores derivados de BT-474, mientras que en los tumores derivados de BT-474.R, se observó una estabilidad del tamaño tumoral durante las 3 semanas de tratamiento (91% respecto al 100% del día 0) (Figura 22). La tasa de crecimiento en el grupo de tratamiento con trastuzumab 10 mg/kg fue significativamente mayor en los tumores derivados BT-474.R que en los derivados de BT-474 ($p<0,001$). Estos resultados sugieren que la línea celular BT-474.R generada presenta un fenotipo estable de resistencia a trastuzumab.

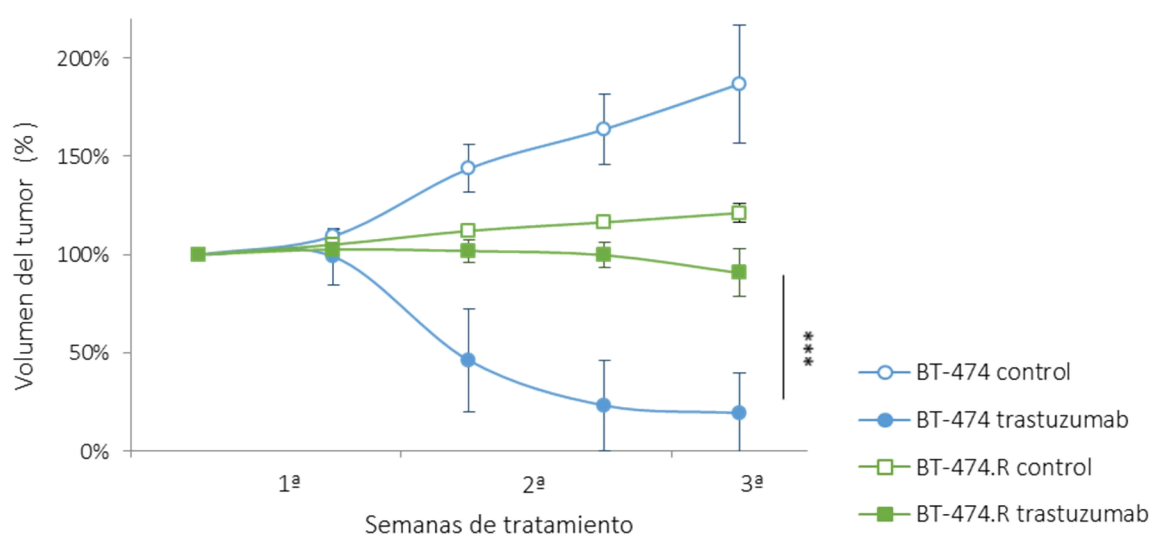


Figura 22. Modelo murino con las células BT-474 y BT-474.R para la valoración de la resistencia adquirida a trastuzumab. Los tumores de ~100 mm³, se distribuyeron en dos grupos: control 10 mg/kg IgGk o trastuzumab 10 mg/kg. Los tumores derivados BT-474.R, presentaron un crecimiento significativamente mayor a lo tumores derivados de BT-474 en el grupo de tratamiento con trastuzumab 10 mg/kg ($p<0,001$).

En los tumores obtenidos de cada uno de los 4 grupos realizados se realizó un corte histológico con tinción de hematoxilina/eosina (H&E) para confirmar la presencia de componente tumoral y sus características morfológicas, que eran superponibles en ambos modelos, mostrando una proliferación de células epiteliales marcadamente atípicas, con infiltración de tejidos blandos peritumorales. También, se analizaron los niveles de expresión de HER2 mediante IHQ y para la amplificación mediante FISH. Además, de la expresión de la forma fosforilada de la histona 3 (p-H3 (Ser10)) y la forma truncada de la caspasa 3 (cleaved caspase-3 (Asp175)), para valorar el efecto del tratamiento con trastuzumab en proliferación celular y activación de apoptosis (Figuras 23 y 24).

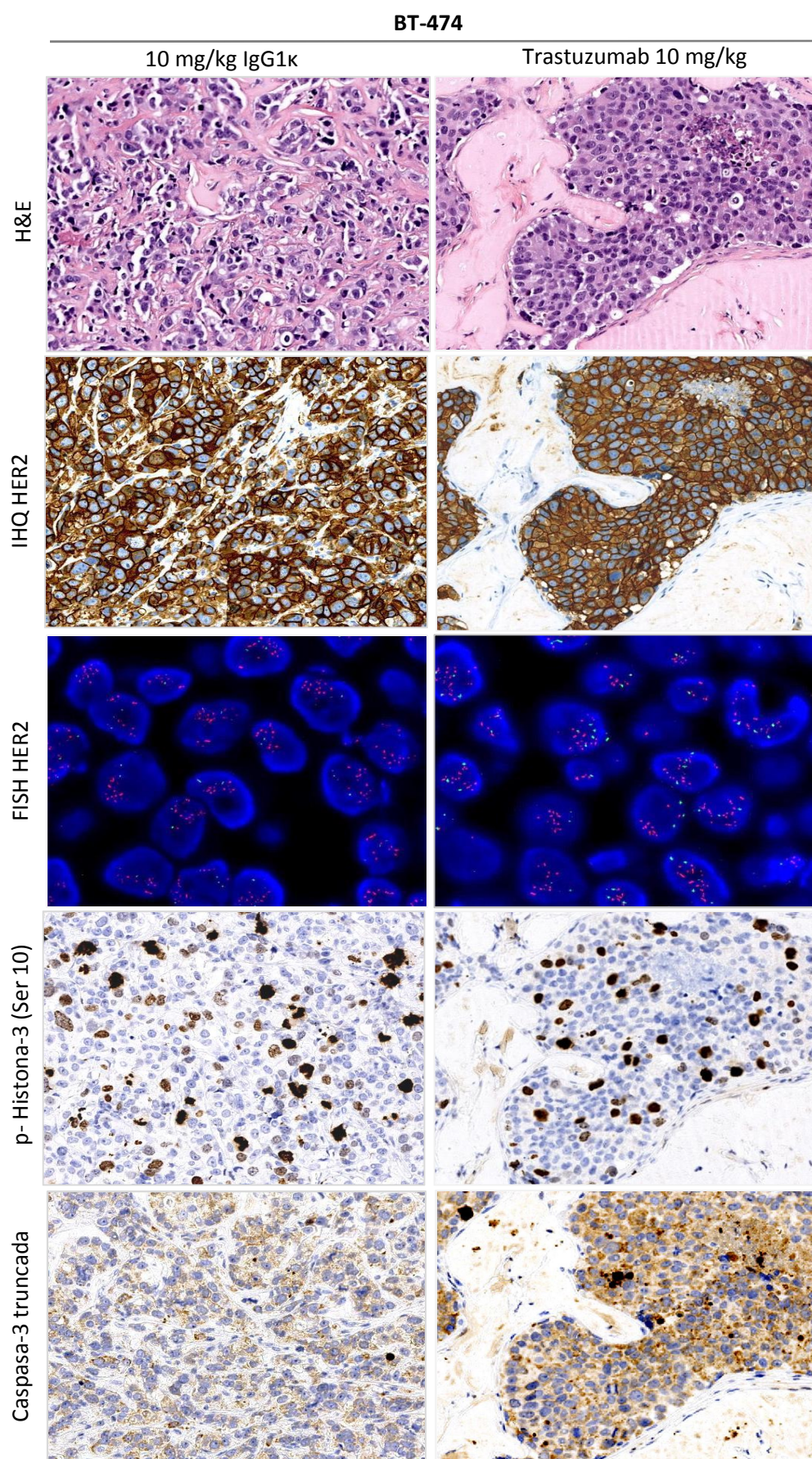


Figura 23. Imágenes ilustrativas de la tinción de H&E, IHQ para HER2, p-Histona3 y caspasa-3 truncada, y FISH de HER2 de los tumores derivados de la línea BT-474, en los dos grupos de tratamiento (200X).

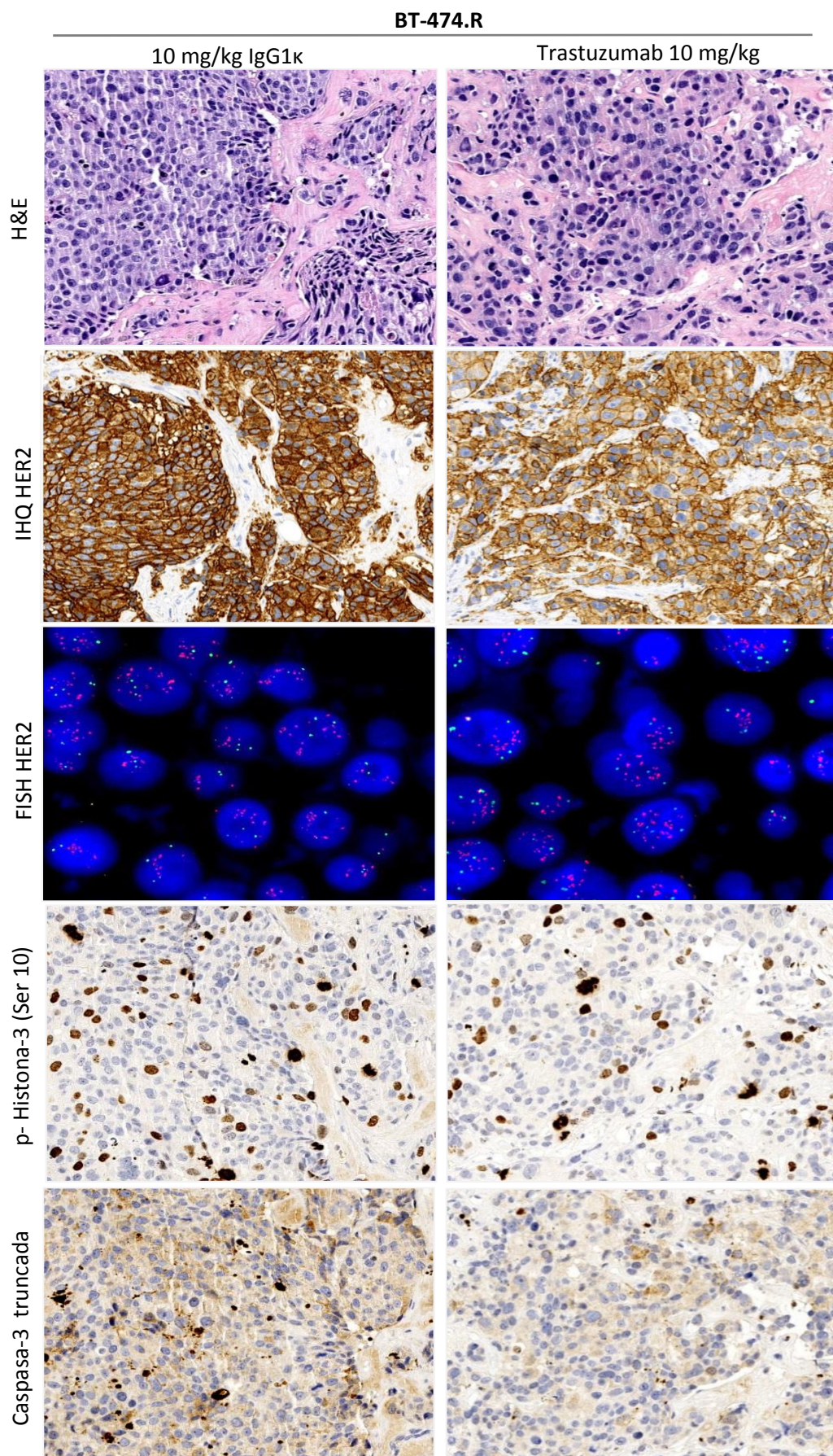


Figura 24. Imágenes ilustrativas de la tinción de H&E, IHQ para HER2, p-Histona3 y caspasa-3 truncada, y FISH de HER2 de los tumores derivados de la línea BT-474.R en los dos grupos de tratamiento (200X).

Todos los tumores evaluados presentaron sobreexpresión de HER2 y amplificación del gen mediante FISH. En los tumores derivados de la línea BT-474 (Figura 23), en el grupo de tratamiento con trastuzumab, se observó una menor expresión de p-H3 (Ser10) respecto al grupo control, lo que indica que existe una menor proliferación celular de esos tumores en presencia de trastuzumab, y un incremento de la expresión de caspasa 3 truncada, lo que señala un incremento de la activación de la apoptosis.

En el grupo de tumores derivados de la línea BT-474.R (Figura 24) tratados con trastuzumab, se identificó una disminución de la fosforilación de p-H3 respecto al grupo control, existiendo una inhibición de la proliferación celular, pero sin embargo no se observó un incremento de la expresión de la forma truncada de caspasa 3 en el grupo de tratamiento respecto al control, por lo que no existe activación de la apoptosis en estos tumores en presencia de trastuzumab.

3.3 Caracterización de las líneas celulares de cáncer de mama HER2 con resistencia adquirida a trastuzumab

Durante el proceso y una vez finalizada la generación de las líneas con resistencia adquirida al trastuzumab, se ha realizado la caracterización de las líneas celulares.

3.3.1 Caracterización del fenotipo

Una vez concluido el proceso de generación de resistencia a trastuzumab fue necesario evaluar si existían modificaciones el fenotipo de las nuevas líneas. Mediante técnicas de IHQ se valoró la expresión de RE, RP y HER2 en *pellets* celulares FFPE de 4 líneas sensibles y sus correspondientes líneas resistentes. Además, se valoró la amplificación del gen HER2 mediante técnicas de FISH.

Se determinó que existía positividad nuclear intensa en el 90% de los núcleos evaluados correspondiente a BT-474, BT-474.R y positividad nuclear débil en el 60% de los núcleos en EFM-192A y EFM19-2A.R para RE y RP. No se detectó expresión nuclear de RE y RP en las células SK-BR-3, SK-BR-3.R, AU565 y AU565.R. En la valoración de la IHQ de HER2 se observó positividad intensa y completa de membrana, en todas las líneas, considerándolas sobreexpresión con un patrón HER2 (3+) (Figuras 25, 26, 27 y 28). De acuerdo con los criterios establecidos [25,29] BT-474, BT-474.R y EFM19-2A y EFM19-2A.R son RE/RP positivos y HER2 positivas y, SK-BR-3, SK-BR-3.R, AU565 y AU565.R, son ER/PR negativas y HER2 positivas, no existiendo diferencias en la expresión entre las líneas resistentes a trastuzumab generadas y sus correspondientes células parentales sensibles.

La valoración de la amplificación de HER2 se realizó mediante FISH determinando la media del número de señales correspondientes a HER2 y la media de señales de CEP17, así como el ratio HER2/CEP17, en este caso se valoraron un total de 200 núcleos. En todas las líneas analizadas se detectó una media de señales de HER2 de entre 10-30, y una media de 2-3 señales del CEP17, siendo el ratio HER2/CEP17 > 2 , considerándose como amplificadas para el gen HER2, como se recoge en las guías de recomendación de interpretación de HER2 en cáncer de mama [29]. Las líneas con resistencia adquirida a trastuzumab presentaron el mismo número de señales HER2 detectado que su correspondiente línea parental (Figuras 25, 26, 27 y 28).

En la mayoría de las líneas estudiadas se detectó heterogeneidad en la amplificación de HER2, observándose un porcentaje de células, variable según la línea, que no presentan amplificación de HER2 (con HER2/CEP17 ratio < 2 y copias de HER2 < 4) (Tabla 16). Estas poblaciones celulares sin amplificación de HER2 fueron observadas tanto en las líneas sensibles a como en sus correspondientes líneas resistentes, así como las células con resistencia primaria a trastuzumab. El mayor porcentaje de núcleos sin amplificación de HER2 estaba presente en las líneas SK-BR-3 y SK-BR-3.R, con un 14,39% y 12,28%, respectivamente, y en EFM19-2A, con un 15,08% y en su correspondiente resistente, con un 16,01%. Sin embargo las líneas BT-474, AU565 y sus líneas resistentes derivadas de las mismas no presentaron núcleos sin amplificación de HER2.

Línea celular	Número de copias HER2	Número de copias CEP17	Ratio HER2/CEP17	Porcentaje de células tumorales con ratio < 2.0 y número de copias de HER2 < 4.0
BT-474	35,40	1,72	22,40	0,00%
BT-474.R	30,17	1,88	17,77	0,00%
SK-BR-3	8,04	4,93	1,64	14,39%
SK-BR-3.R	10,35	3,59	3,18	12,28%
AU565	17,55	3,18	6,00	0,00%
AU565.R	16,17	2,67	6,62	0,00%
EFM19-2A	14,62	1,95	9,07	15,08%
EFM19-2A.R	13,57	2,32	6,49	16,01%
HCC1954	27,26	3,42	7,65	12,38%
HCC1419	34,67	3,92	9,38	0,00%
HCC1569	12,17	2,22	7,62	20,73%
JIMT1	12,76	1,81	7,88	2,35%

Tabla 16. El estudio mediante FISH de HER2 confirmó que existe un similar de porcentaje de células sin amplificación de HER2 con menos de 4 copias del gen.

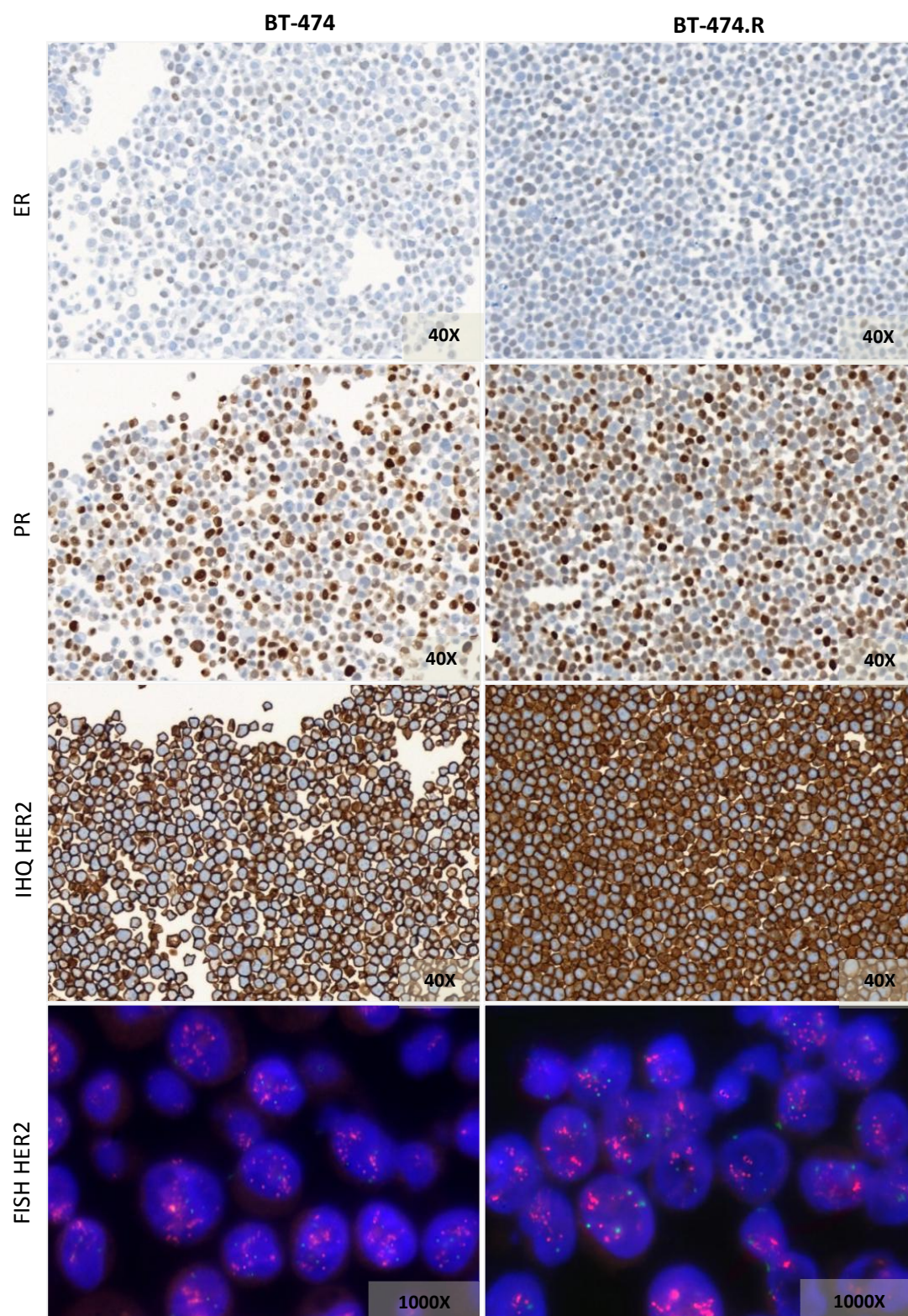


Figura 25. Caracterización de las líneas celulares BT-474 y BT-474.R mediante IHQ y FISH. Detección mediante IHQ de la expresión de RE, RP y HER2, y detección de amplificación del HER2 mediante FISH. Las poblaciones sensible y resistente de esta línea celular no mostraron cambios en la expresión de las proteínas estudiadas.

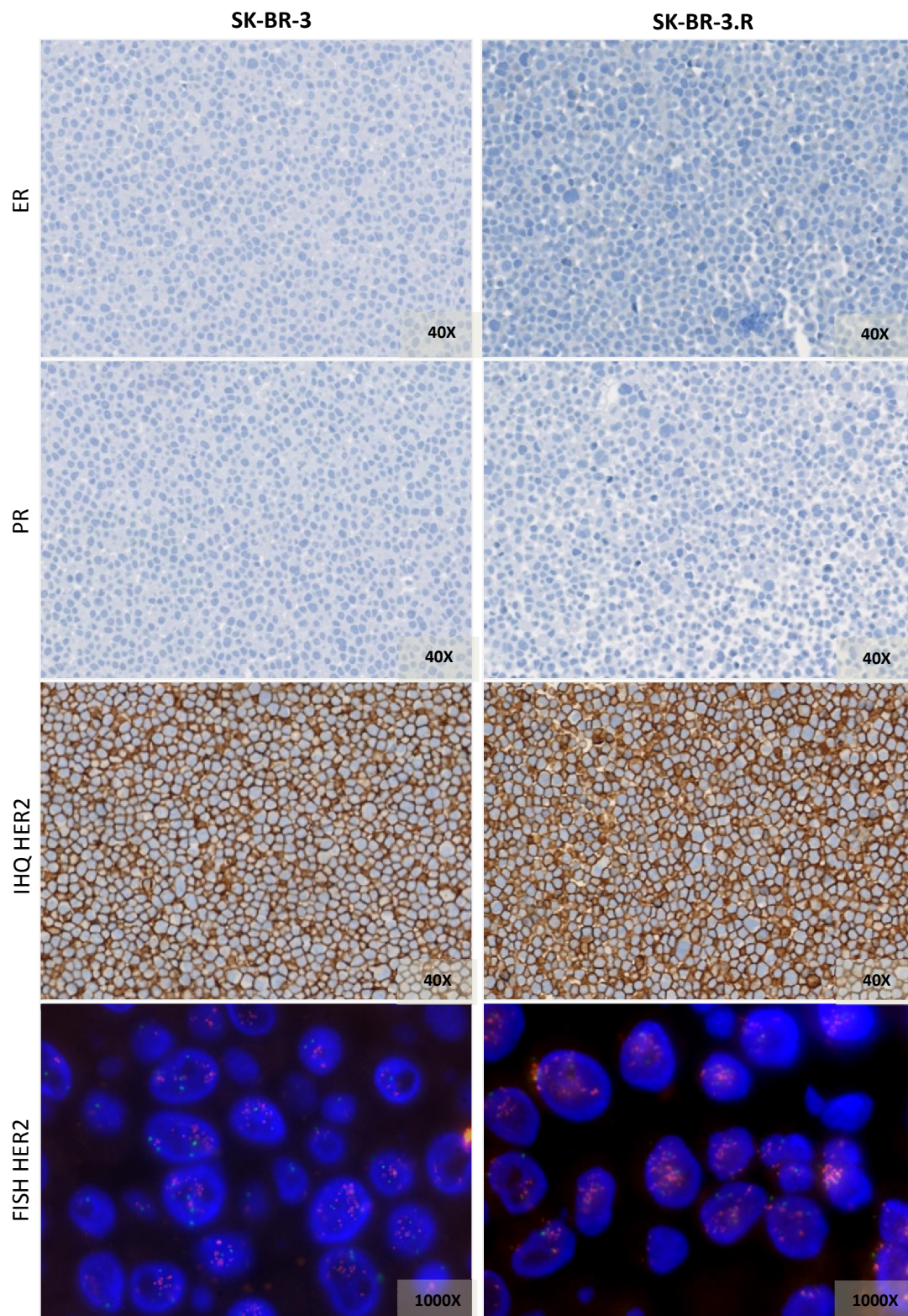


Figura 26. Caracterización del perfil de expresión de RE, RP y HER2 mediante IHQ, y amplificación del gen HER2 mediante FISH en las líneas celulares SK-BR-3 y SK-BR-3.R. No se observan diferencias de expresión entre las líneas sensibles y la línea con resistencia adquirida a trastuzumab.

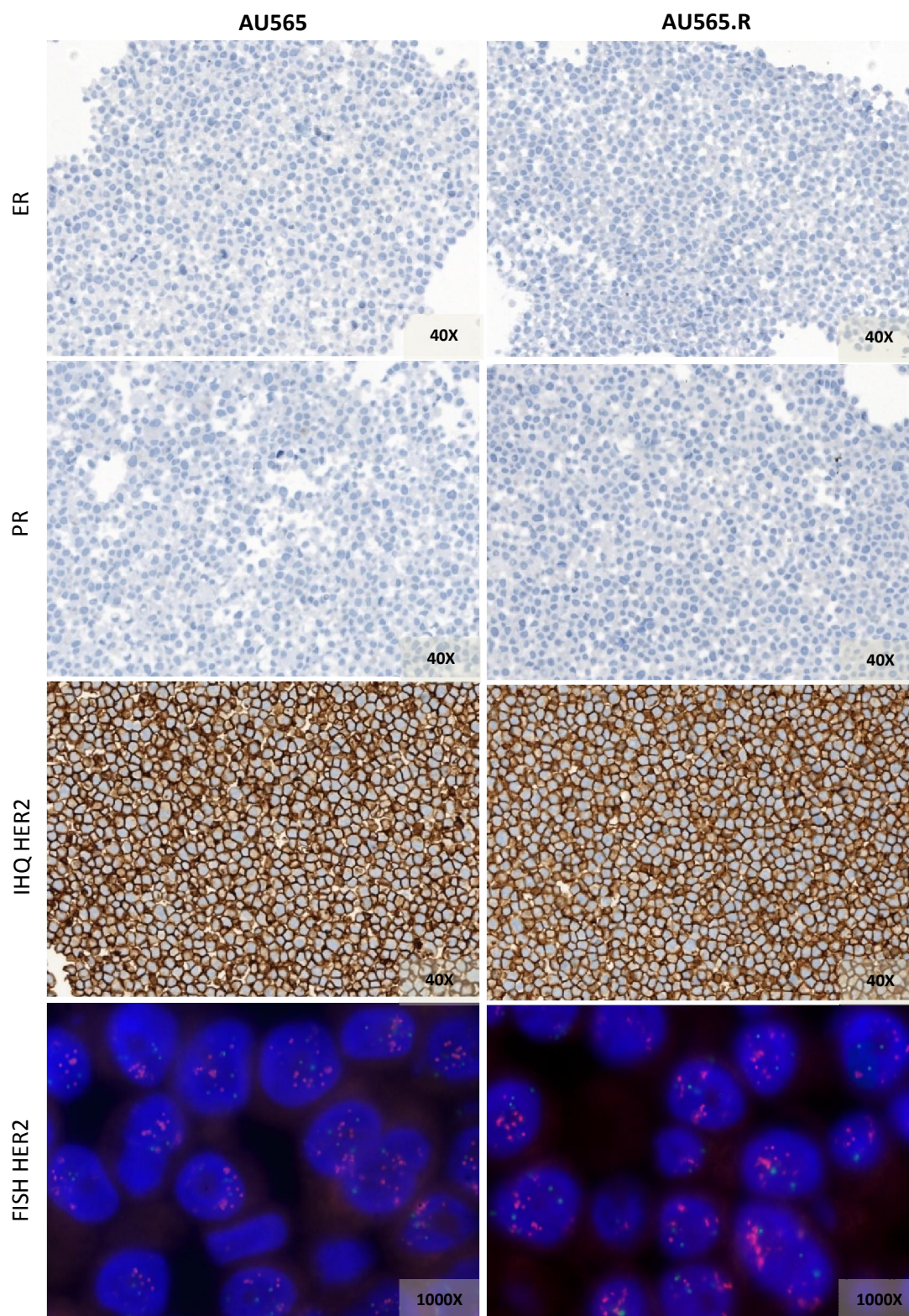


Figura 27. Caracterización de la línea celular sensible a trastuzumab, AU565, y la línea celular con resistencia adquirida, AU565.R, mediante IHQ para la valoración de la expresión de RE, RP y HER2 y amplificación del gen HER2 mediante FISH. No se detectaron cambios en la expresión de las proteínas en las poblaciones estudiadas.

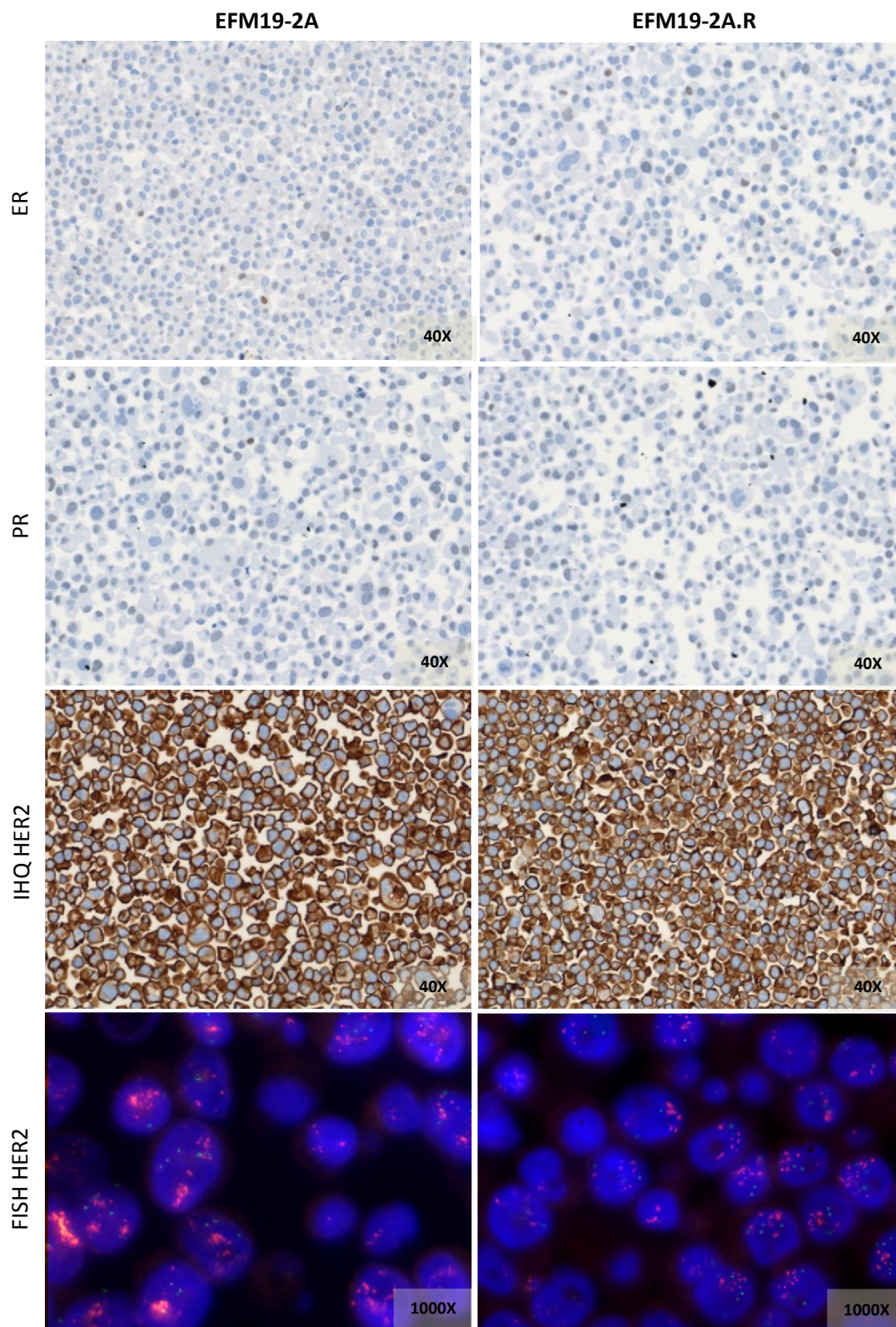


Figura 28. Caracterización de las líneas celulares EFM19-2 A y EFM19-2A.R mediante IHQ de la expresión de RE, RP y HER2 y amplificación del gen HER2 mediante FISH. Las poblaciones sensible y resistente de esta línea celular no mostraron cambios en la expresión de las proteínas estudiadas.

Estos resultados confirmaron que la adquisición de resistencia *de novo* a la terapia con trastuzumab en nuestros modelos celulares no se debe cambios sustanciales en la sobreexpresión o amplificación del receptor HER2.

3.3.2 Valoración de los niveles de fosforilación en proteínas implicadas en la señalización celular mediada por el receptor HER2

La sobreexpresión de HER2 provoca activación, fundamentalmente, de las rutas de señalización celular PI3K/AKT/mTOR y RAS/MAPKs. Para valorar posibles diferencias en la activación de ambas rutas se empleó un array de fosfo-proteínas comercial que permite la detección de los niveles de fosforilación de 28 receptores tirosina-quinasa (RTKs) y 11 proteínas implicadas en las rutas de señalización de HER2, donde se compararon las celulares con resistencia adquirida frente a sus líneas parentales correspondientes (BT-474.R/BT-474, SK-BR-3.R/SK-BR-3, AU-565.R/AU-565 y EFM19-2A.R/EFM19-2A).

En todos los casos se detectó una intensa especificidad de señal en los controles positivos y negatividad para los controles negativos. Los niveles de fosforilación de las dianas se normalizaron a la intensidad de señal media de los controles positivos (% de fosforilación relativo al control) (Figura 29).

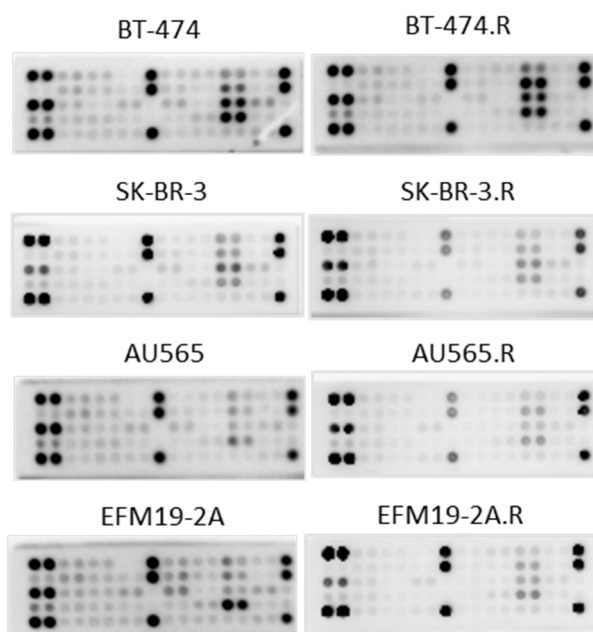
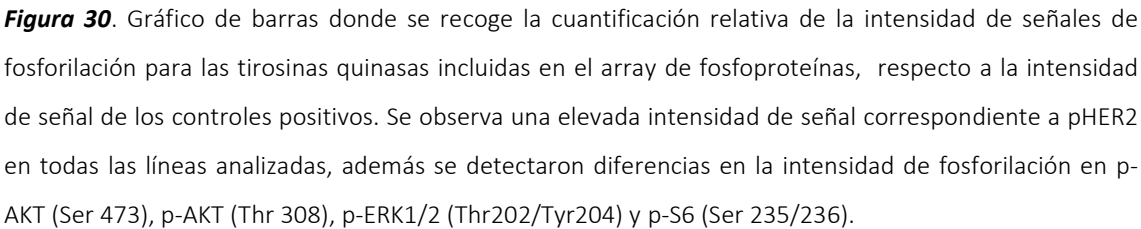


Figura 29. Imagen del array de fosfoproteínas realizado a partir de extractos celulares de las líneas BT-474.R/BT-474, SK-BR-3.R/SK-BR-3, AU-565.R/AU-565 y EFM19-2A.R/EFM19-2A obtenida mediante quimioluminiscencia con el equipo Amersham Imager 600RGB y analizada con el software ImageQuant TL v8.1. Se observan diferencias de intensidad en las señales de fosforilación entre las líneas sensibles y resistentes bajo adecuados controles positivos y negativos.



110

este grupo de dianas sobreexpresadas en todas las líneas, destacaron p-AKT-(Thr 308), p-AKT (Ser473), p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y S6RP (Figura 30), miembros de las rutas de señalización celular hiperactivadas en tumores HER2 positivos. Se observaron diferencias entre las células sensibles y resistentes en los niveles de fosforilación del receptor HER2, detectando que SK-BR-3.R presentaba un incremento de la fosforilación del receptor respecto a SK-BR-3, mientras que en EFM19-2A.R se detectaba menor fosforilación de HER2 frente a EFM19-2A; los niveles de fosforilación de AKT (Ser 473) se incrementan en BT-474.R respecto a BT-474, al igual que la fosforilación de S6PR en AU565.R en relación a AU565 (Figura 30).

Los resultados obtenidos en el array de fosfo-proteínas fueron validados mediante inmunodetección para las proteínas HER2, AKT, p-AKT (Ser 473), p-AKT (Thr 308), ERK, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), S6RP y p-S6 (Ser 235/236), empleando como control de carga GAPDH. Además también se valoró el efecto en la fosforilación de estas proteínas tras la exposición a trastuzumab durante 48 y 72 horas en las líneas celulares resistentes a trastuzumab generadas y sus correspondientes sensibles (Figura 31).

Comparando los niveles de expresión de las proteínas estudiadas a nivel basal entre las líneas sensibles y sus correspondientes células resistentes se observó que existe un incremento de los niveles de p-AKT (Ser 473) en BT-474.R (1.21 vs 0.82), confirmado los resultados del array de fosfoproteínas. Este incremento también se observó en AU565.R (0.94 vs 0.72), sin detectarse modificaciones en la expresión de AKT total. Sin embargo, el incremento de los niveles de p-S6 (Ser 235/236) en AU565.R respecto a AU565, detectado en el array, no se confirmó, observándose un nivel de fosforilación muy similar (1.03 vs 1.14). Además, se determinó que existía un aumento de p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) en BT-474.R, SK-BR-3 y EFM19-2A en relación a sus líneas parentales (1.12 vs 0.38, 0.73 vs 0.37, 2.06 vs 0.94 respectivamente), sin observarse modificación de expresión en ERK total.

El análisis de fosforilación en las condiciones de tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml a 48 y 72 horas se observó que trastuzumab provoca el efecto esperado de inhibición de las rutas de señalización PI3K/AKT/m TOR y RAS/MAPKs en las líneas parentales (BT-474, SK-BR-3 y AU565), disminuyendo los niveles de fosforilación de p-AKT (Ser 473), p-AKT (Thr 308), p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y p-S6 (Ser 235/236). En la línea EFM19-2A no se observan los efectos esperados del tratamiento con trastuzumab.

En las líneas con resistencia adquirida a trastuzumab BT-474.R, SK-BR-3.R y AU565.R, sin embargo, el tratamiento a 48 y 72 horas de trastuzumab, no provoca una disminución de los niveles de fosforilación de p-AKT (Ser 473) y (Thr 308), como ocurre en las líneas parentales. Del

mismo modo, no se observa disminución de los niveles de fosforilación de p-S6 (Ser 235/236) en BT-474.R y SK-BR-3.R en presencia del tratamiento, como ocurre en BT-474 y SK-BR-3.

Estos datos ponen de manifiesto que en las líneas resistentes a trastuzumab existe una hiperactivación de las rutas de señalización PI3K/AKT/mTOR y/o RAS/MAPKs que pueden estar implicadas en el mecanismo de resistencia del modelo celular desarrollado.

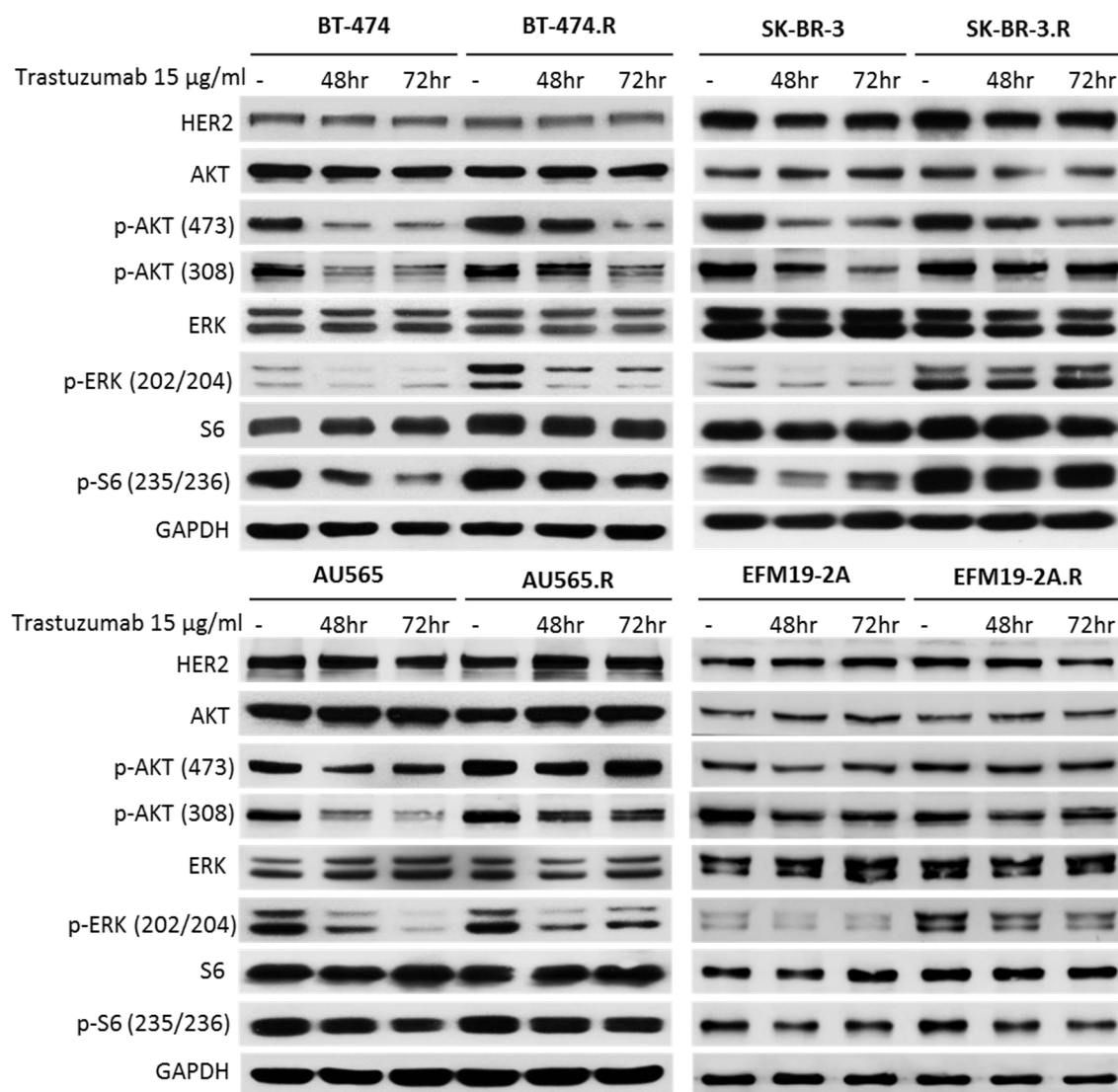


Figura 31. Valoración de los resultados obtenidos en el array de fosfoproteínas realizado mediante inmunodetección en extractos de las líneas BT-474/ BT-474.R, SK-BR-3/ SK-BR-3.R, AU565/AU565.R y EFM19-2A/ EFM19-2A.R en condiciones basales y tras 48 y 72 horas de tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml. Bajo un adecuado control de carga con GAPDH, se observaron diferencias en los niveles de fosforilación entre las líneas resistentes y sensibles en condiciones basales, además el tratamiento con trastuzumab provocó distinta modulación de la fosforilación entre las líneas resistentes y sensibles.

3.4 Valoración de perfiles de expresión génica mediante microarrays de las líneas de cáncer de mama HER2 con resistencia adquirida a trastuzumab

Después de confirmar que la resistencia a trastuzumab es un proceso estable y que el fenotipo de las líneas generadas es idéntico al de sus parentales, pero que existen diferencias a nivel de fosforilación de proteínas entre sensible y resistente y en respuesta al tratamiento, se propuso valorar la existencia de diferencias a nivel génico entre las líneas con resistencia a trastuzumab y sus correspondientes líneas sensibles en ausencia o presencia del fármaco. Este proceso se llevó a cabo mediante el array Affymetrix Human Gene ST 2.0 Arrays ST, en las 4 líneas generadas y sus parentales tras 48 horas en presencia o ausencia de trastuzumab 15 µg/ml a partir de 1 µg de RNA por duplicado.

El análisis de componentes principales (PCA) evidenció que se detectan, en todos los casos, dos poblaciones independientes correspondientes a las células sensibles y resistentes, lo que indica que existen diferencias en el patrón de expresión génica entre sensibles y resistentes. Además, indicó que estas diferencias se observan de forma independiente a la presencia de trastuzumab

En el análisis de los arrays de expresión de todas las condiciones estudiadas se obtuvieron datos de nivel de expresión en un promedio de 10.508 genes, presentando la inmensa mayoría valores cercanos a 0, lo que indica que estos genes no se encuentran diferencialmente expresados en las líneas resistentes a trastuzumab generadas frente a sus parentales, y que el tratamiento con trastuzumab no provoca importantes cambios en el perfil genómico de las células. Se consideró que existían cambios significativos en la expresión génica en aquellos genes que presentaban valores de $-2 \geq \log FC \geq 2$ y un p-valor $< 0,05$. Empleando este punto de corte se identificaron: 26 genes diferencialmente expresados entre BT-474 y BT-474.R; 3 genes entre SK-BR-3 y SK-BR-3.R; 1 único gen entre AU565 y AU565.R; y 6 genes entre EFM19-2A y EFM19-2A.R. Debido a que no existieron importantes genes diferencialmente expresados entre SK-BR-3 y SK-BR-3.R, AU565 y AU565.R, EFM19-2 A y EFM19-2 A.R y que nos existían genes comunes entre líneas, se seleccionaron las líneas BT-474 y BT-474.R para los estudios posteriores.

De los 26 genes diferencialmente expresados entre BT-474 y BT-474.R, 10 (PIP, MUC19, BPIFB1, FMOD, P2RY10, UPK1A, TCEA3, SCGB2A1, SERPINB5, TACSTD2) muestran valores de $\log FC < -2$, lo que indica que estos genes presentan una menor expresión en BT-474.R en relación a los niveles de expresión en BT-474; y 16 (CXCL10, CCL5, IFIT3, IFNL2, IFI44, IFI6, IFIT1, CXCL11, IFI44L, HERC5, IFIT2, OAS1, IFNL1, OASL, TEAD2) presentan valores de $\log FC < 2$ que indica que estos genes se encuentran sobreexpresados en BT-474.R frente a BT-474 (Figura 32).

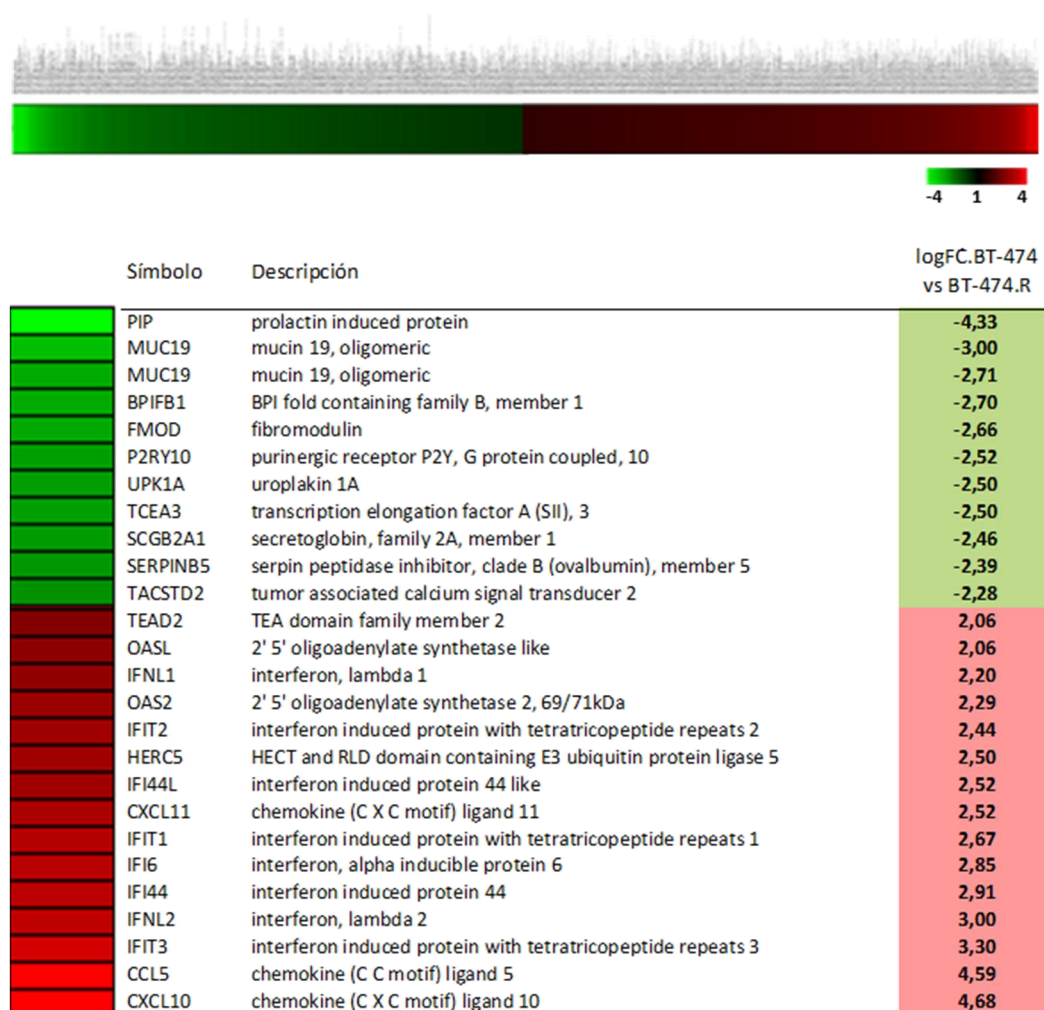


Figura 32. Relación de los 26 genes diferencialmente expresados, $-2 \leq \log FC \leq 2$ y un p-valor $< 0,05$ de BT-474 frente a BT-474.R, identificados mediante array de Affymetrix Human Gene ST 2.0 Arrays ST. Los valores negativos (verde) indican que estos genes se encuentran significativamente menos expresados en BT-474.R frente a BT-474, mientras que los valores positivos (rojo) presentan aquellos genes significativamente sobreexpresados en BT-474.R frente a BT-474.

3.4.1 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

El Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) es un método computacional que permite determinar e identificar si un grupo de genes muestra diferencias estadísticamente significativas entre dos estados biológicos. En el caso del análisis del *microarray* de expresión en que se comparó la línea BT-474.R frente a BT-474, se demostró que el gene set de ERBB2 (HER2) se encuentra enriquecido en BT-474.R, y que los genes sobreexpresados en esta línea respecto a la parental contribuyen al enriquecimiento de este gene set. Los genes que contribuyen con mayor significancia son las proteínas de inductoras de interferón IFI44, IFIT1, IFI44L, todas ellas miembros de la familia de la citoquinas (Figura 33).

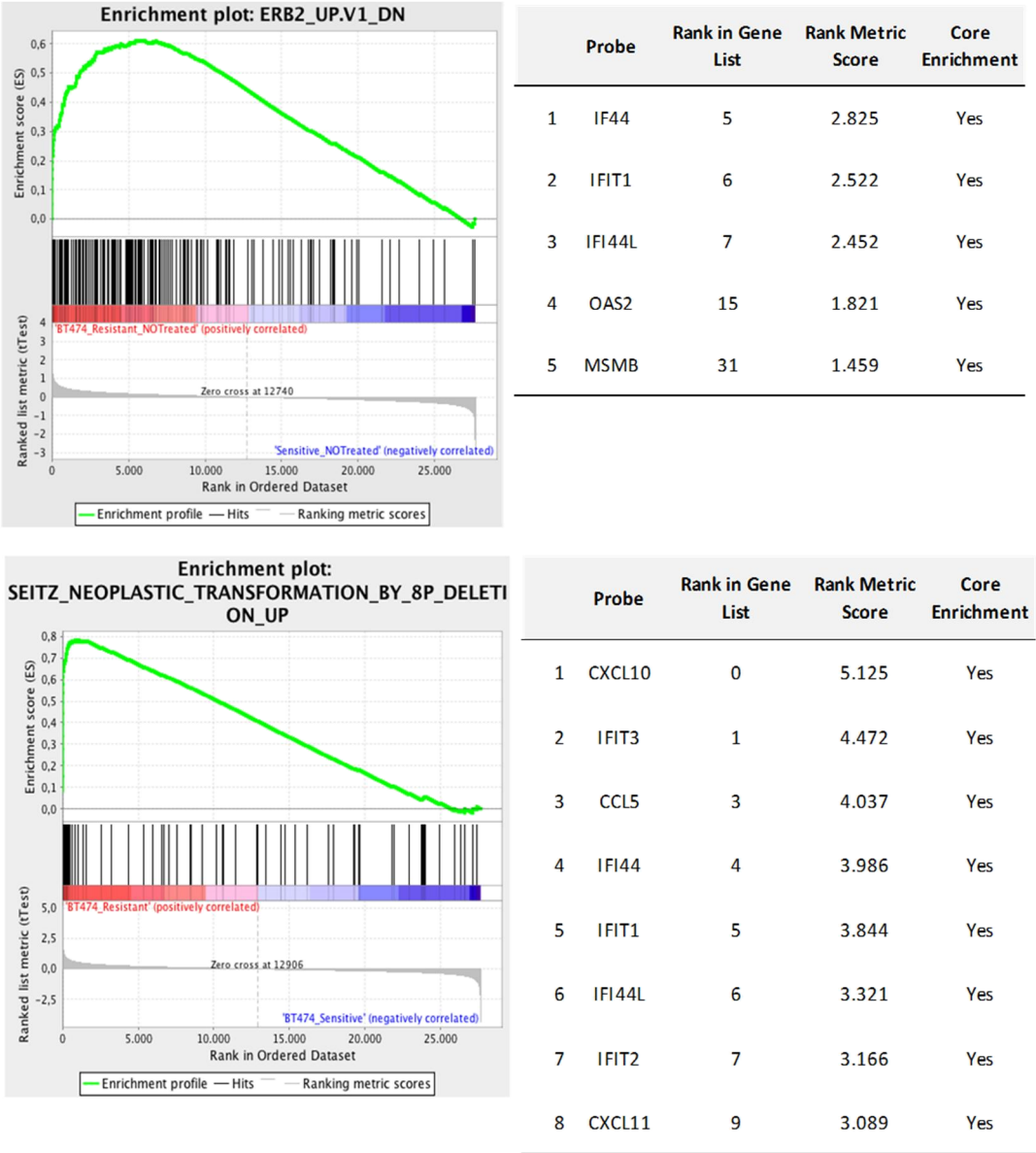


Figura 33. Imagen representativa del análisis de Gene Set Enrichment Analysis con los datos obtenidos del array de expresión realizado en las líneas BT-474 y BT-474.R. En la imagen superior se muestra el grafico de Enrichment Score del gene set de ERBB2, acompañado de los genes que están contribuyendo al enriquecimiento de este gene set. En la imagen inferior se observa el gráfico correspondiente al gene set denominado Neoplastic_Transformation publicado por Seitz y colaboradores en 2005 [178] y el listado de genes que contribuyen al enriquecimiento del gene set.

3.4.2 Validación de los resultados obtenidos en el array de expresión

De los 26 genes diferencialmente expresados en el array para BT-474 y BT-474.R, se seleccionaron 5 de ellos, todos ellos pertenecientes a la superfamilia de citoquinas, en base al resultado del GESA y dada su implicación en procesos de proliferación y metástasis en diferentes tipos cáncer, incluyendo cáncer de mama.

Estos 5 genes, CXCL10, CCL5, CXCL11, IFNL1 e IFNL2, se encuentran sobreexpresados en BT-474.R frente a BT-474. La validación de esta sobreexpresión se ha realizado mediante ensayos específicos de qPCR a partir de ARNm. Tras el análisis de expresión relativa, empleando el algoritmo definido por Pfaffl, se validó el resultado del array de expresión para los 5 genes seleccionados. CCL5, CXCL10, IFNL1 presentaron niveles de expresión altamente elevados en la línea BT-474.R frente a su parental sensible, mientras que la sobreexpresión de CXCL11 e IFNL2 fue más moderada (Figura 34).

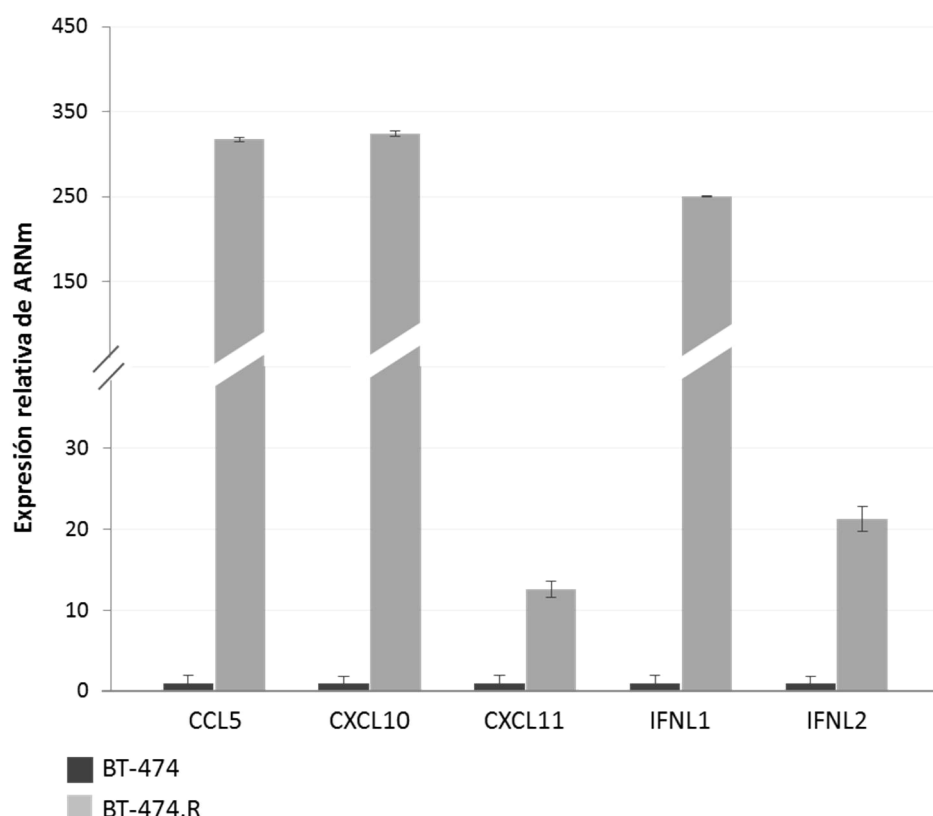


Figura 34. Validación de los resultados obtenidos en el array de expresión génica para los genes CCL5, CXCL10, CXCL11, IFNL1 e IFNL2 mediante qPCR en las líneas celulares BT-474 y BT-474.R. En todos los genes se observa un incremento de expresión en la línea BT-474.R frente a la línea sensible.

Además, dado que estos 5 genes presentan sobreexpresión en la BT-474.R, se han valorado los niveles de expresión de estos genes en las células de cáncer de mama con resistencia adquirida generadas junto con sus células parentales sensibles y en las líneas con resistencia primaria a trastuzumab, HCC1954, HCC1569 y JIMT1.

Se detectó sobreexpresión respecto a los niveles de BT-474, en las tres líneas con resistencia primaria analizadas junto con BT-474.R, de CXCL10 y CXCL11. Además, CXCL11 también presenta sobreexpresión en la línea EFM19-2A.R, respecto a su línea sensible. Sin embargo únicamente se detectó incremento de la expresión de CCL5 en la línea HCC1569 respecto a los

niveles de BT-474, además de en BT-474.R. El resto de líneas analizadas, tanto sensibles como las líneas con resistencia adquirida no mostraron un incremento de la expresión de ninguna de la quimioquinas detectadas en el array de expresión (Figura 35).

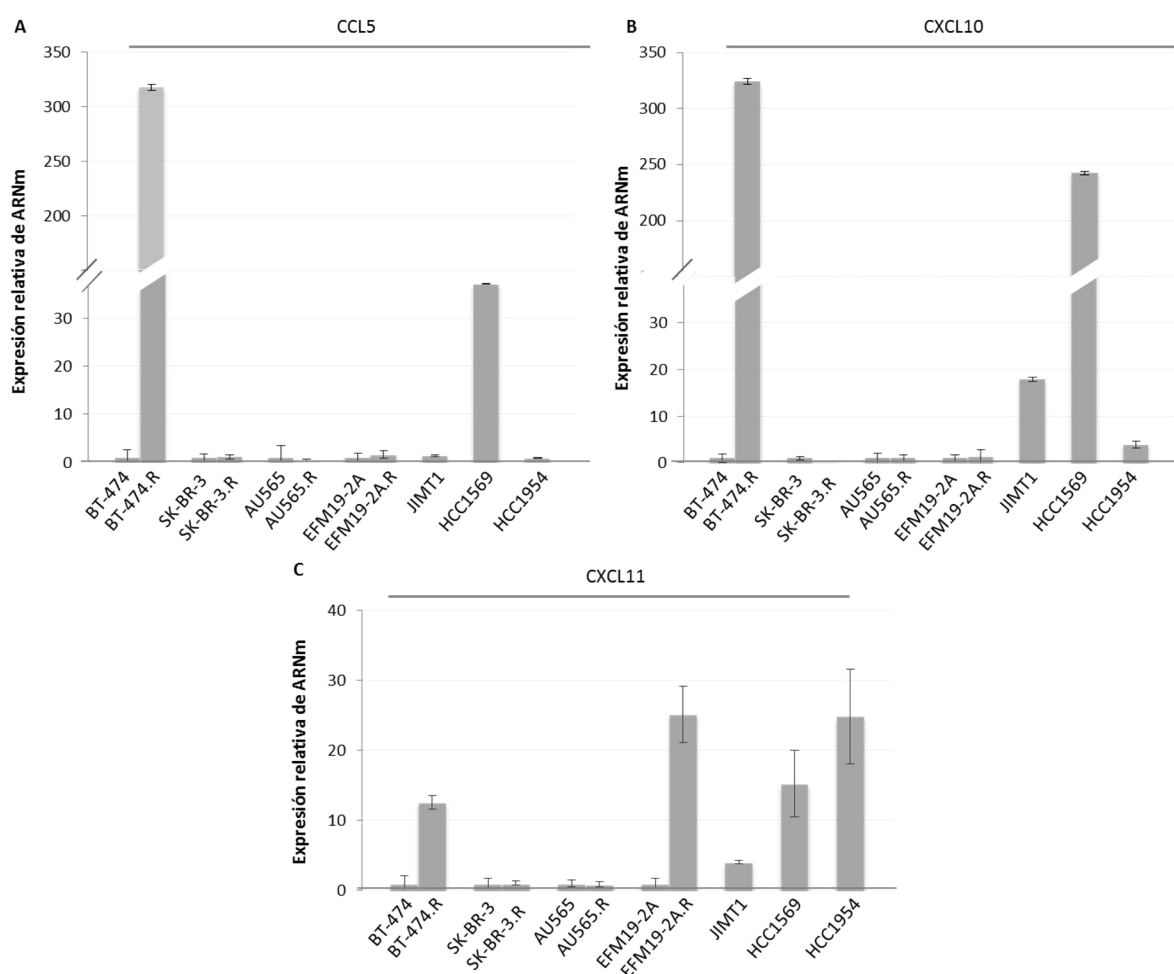


Figura 35. Validación de los resultados obtenidos en el array de expresión génica para los genes CCL5, CXCL10, CXCL11 mediante qPCR en las líneas celulares de cáncer de mama sensibles a trastuzumab, líneas con resistencia adquirida y resistentes primarias.

Se detectó incremento respecto a los niveles de expresión de BT-474 de los niveles de IFNL1 en las líneas resistentes primarias JIMT1 y HCC1569, siendo mucho menores a la sobreexpresión detectada en BT-474.R. Además de en BT-474.R únicamente se detectó incremento de la expresión de IFNL2 en las células AU565.R respecto a su línea parental. En las líneas SK-BR-3.R y EFM19-2A.R no se observó incremento de la expresión de ninguno de los dos interferones respecto a los niveles basales de sus líneas parentales. Además, los niveles de ambos interferones fueron indetectables en la línea HCC1954.

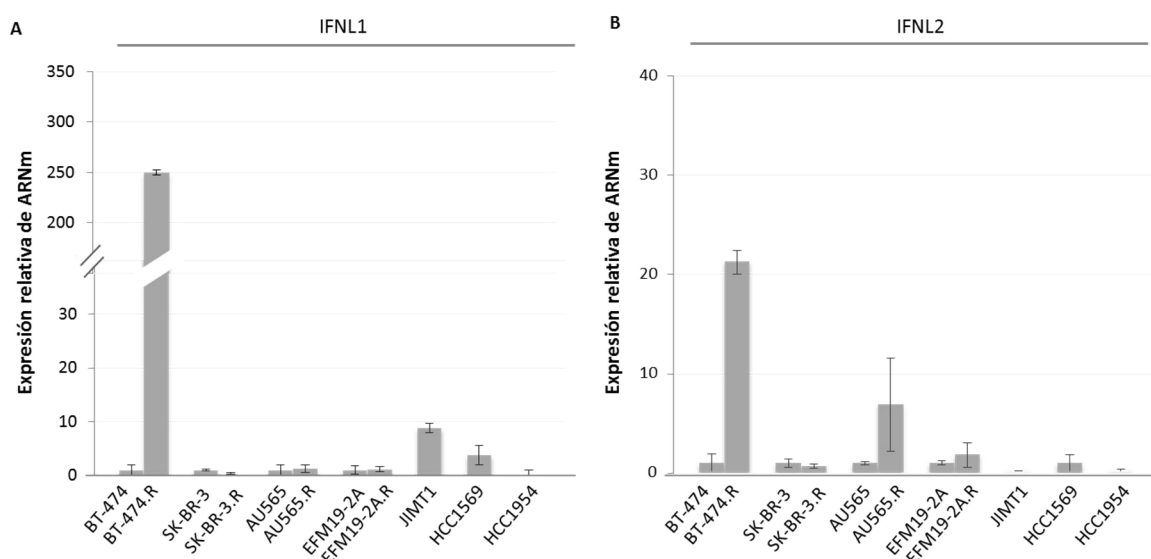


Figura 36. Validación de los resultados obtenidos en el array de expresión génica para los genes IFNL1 e IFNL2 mediante qPCR en las líneas celulares de cáncer de mama sensibles a trastuzumab, líneas con resistencia adquirida y resistente primarias.

4. Implicación de CCL5 en la resistencia adquirida a trastuzumab

La función principal de la quimioquina CCL5 es la quimioatracción del sistema inmune, sin embargo tiene una importante función autocrina en el componente tumoral activando procesos de proliferación, migración y metástasis. Además, se ha descrito que frecuentemente se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama fenotipo basal y HER2 positivo, y en enfermedad avanzada. Aunque las otras quimioquinas detectadas en el array de expresión diferencial realizado en BT-474 y BT-474.R también están descritas en cáncer de mama, su papel es más controvertido, y se asocia principalmente a tumores de mama de tipo luminal.

4.1 CCL5 y resistencia adquirida en modelos in vitro

4.1.1 Validación de los niveles proteicos de CCL5

Tras la validación de la expresión, confirmando la existencia de sobreexpresión de CCL5 a nivel transcripcional en la línea BT-474.R, y en menor medida en las células HCC1569, se realizó inmunodetección para CCL5 para evaluar los niveles de proteína (Figura 37 A), identificándose que existe un notable incremento de CCL5 en BT-474.R respecto a su línea parental, que presentaba niveles de proteína muy similares a la línea HCC1569.

Esta sobreexpresión de proteína también se verificó mediante inmunohistoquímica a partir de secciones de *pellets* celulares FFPE de BT-474, BT-474.R y HCC1569 (Figura 37 B). En BT-474 no se detectó expresión de CCL5, mientras que en BT-474.R se observó expresión de CCL5

heterogénea, detectando células con una intensa tinción. En la línea con resistencia primaria, HCC1569, se identificó una expresión homogénea intermedia de CCL5 en casi la totalidad de las células.

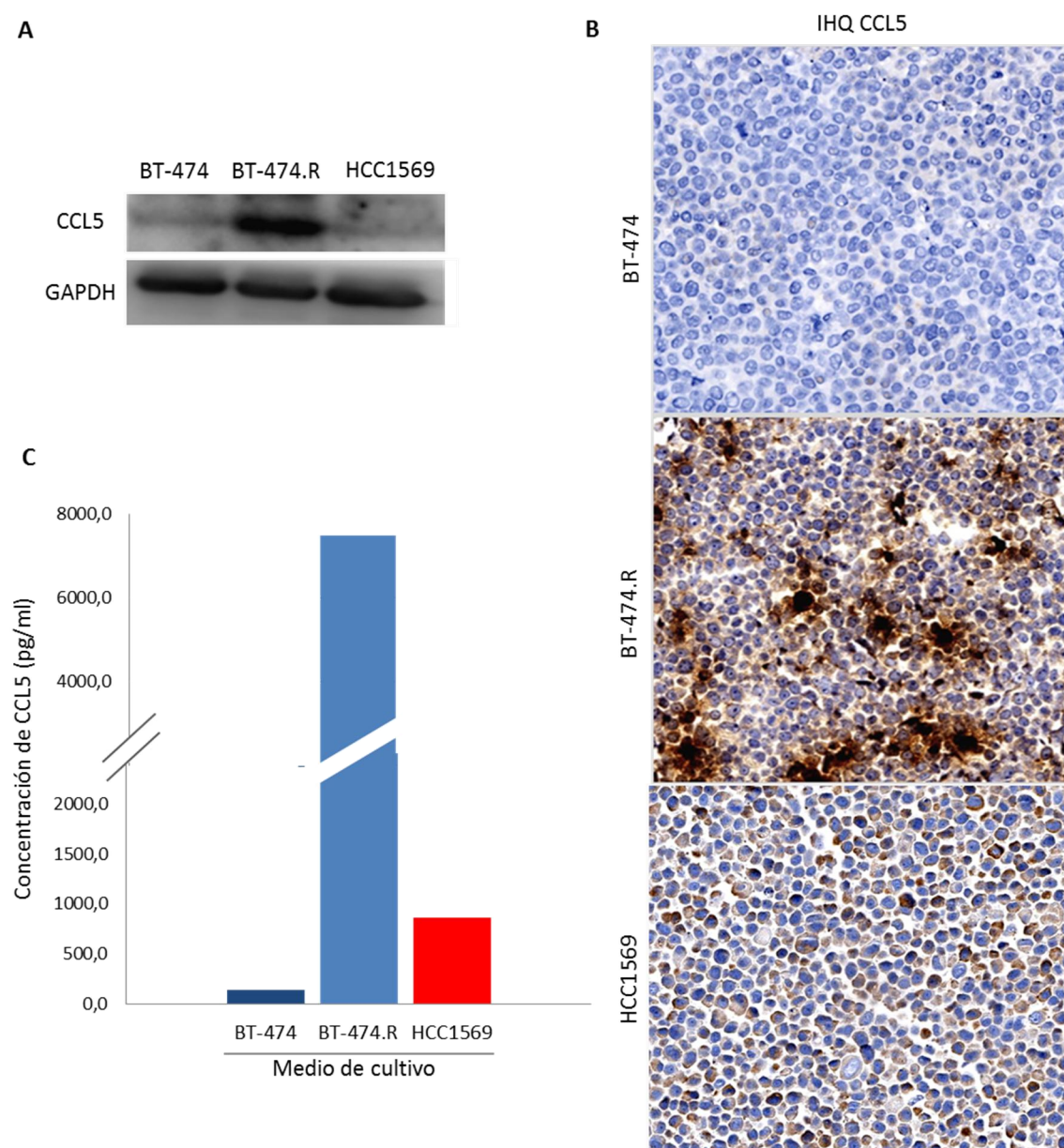


Figura 37. Validación de los niveles proteicos de CCL5 en las líneas celulares BT-474, BT-474.R y HCC1569.

A) Inmunodetección de la expresión de CCL5 a partir de 20 µg de proteína total de cada una de las líneas analizadas, bajo adecuado control de carga, GAPDH; **B)** Imágenes representativas 100X reveladas con DAB, de la expresión de CCL5 mediante IHQ; **C)** Niveles de CCL5 en pg/ml determinados a partir del medio de cultivo de las células indicadas mediante ELISA.

Finalmente, se valoró si la proteína CCL5 producida por las líneas celulares, era secretada al medio, como ocurre en condiciones fisiológicas con la familia de las quimioquinas. Mediante ELISA para CCL5 se detectó que las células BT-474, BT-474.R y HCC1569, secretaban CCL5 al

medio de cultivo (Figura 37 C), determinando que el incremento en la síntesis de CCL5 en la célula con resistencia adquirida a trastuzumab, se traduce en un incremento de la secreción al medio, con una concentración de 7.504,3 pg/ml de CCL5 en BT-474.R frente a 144,35 pg/ml de CCL5 secretados por BT-474.

4.1.2 Silenciamiento de CCL5

Para evaluar la implicación de CCL5 en la resistencia adquirida a trastuzumab, se realizó silenciamiento de CCL5 mediante ARNsi en las líneas BT-474.R y HCC1569, evaluando el efecto del trastuzumab sobre la proliferación celular en presencia de bajos niveles de CCL5.

El silenciamiento de CCL5 en BT-474.R revirtió la resistencia de forma significativa (p-valor 0,0013) en experimentos de conteo de 7 días (Figura 38) (54,18%) respecto a la condición de silenciamiento control (siCT) en presencia de trastuzumab (81,97%), con un valor Δ GR de 1,3 siendo sensible de acuerdo al algoritmo definido por O'Brien [153].

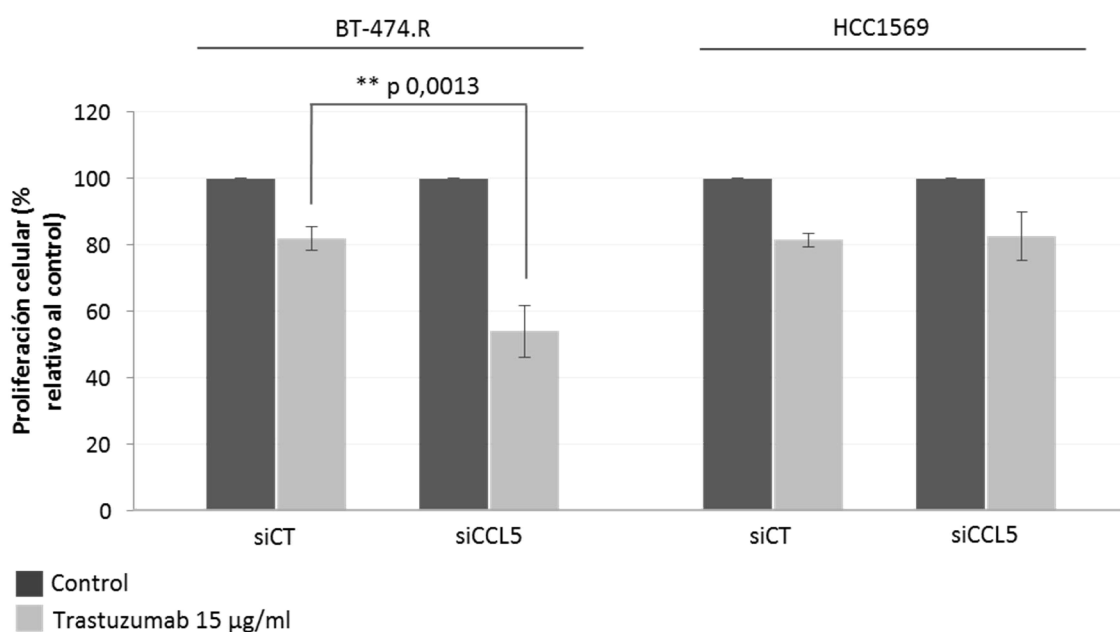


Figura 38. Gráfico de barras del efecto en proliferación celular del silenciamiento de CCL5 en las líneas BT-474.R y HCC1569. El silenciamiento de CCL5 provoca una disminución significativa de la proliferación celular en las células BT-474.R tratadas con trastuzumab 15 µg/ml a 7 días de tratamiento, p-valor 0,003 revirtiendo la resistencia adquirida a trastuzumab. En las células HCC1569 el silenciamiento de CCL5 no provoca efecto en la proliferación en condición de tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml a 7 días, siendo muy similar al control de silenciamiento con trastuzumab.

Sin embargo, este efecto no se observa en la línea HCC1569, en la que el silenciamiento de CCL5 en la no revirtió la resistencia a trastuzumab. La condición de silenciamiento de CCL5 (siCCL5) en presencia de trastuzumab presenta un porcentaje de crecimiento muy similar la condición control (siCT), por lo que esta línea continua presentando resistencia a trastuzumab independientemente de la reducción de los niveles de CCL5 (Figura 38).

La eficiencia del silenciamiento de CCL5 se evaluó mediante qPCR y ELISA (Figura 39 A y B), demostrando, en ambas líneas, una disminución de los niveles de ARNm y proteína en la condición de silenciamiento de CCL5 (siCCL5) frente a la condición control (siCT).

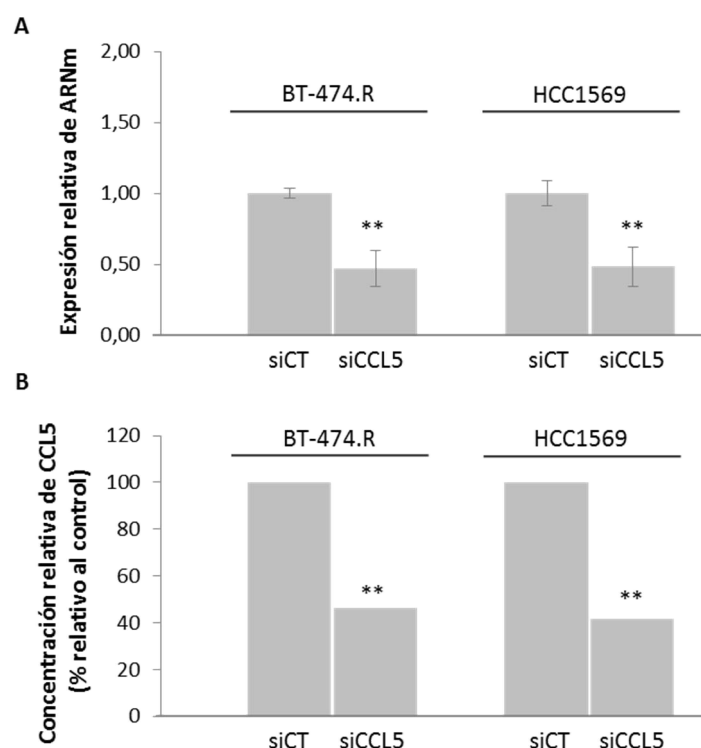


Figura 39. Valoración de la eficiencia a nivel de ARN y proteína del silenciamiento de CCL5 realizado en las líneas BT-474.R y HCC1569. A) La eficacia del silenciamiento de CCL5 se confirmó mediante qPCR a partir de ARNm obtenido 48 horas después de la transfección con el siCT y siCCL5. En ambas líneas se confirma que eficiencia del silenciamiento disminuyendo los niveles de expresión relativa de CCL5 a 0,47, (p-valor 0,01) en BT-474.R y a 0,48 (p-valor 0,02) en HCC1569. B) Mediante ELISA para CCL5 se demostró que existe una disminución de los niveles de CCL5 secretados al medio, después del silenciamiento de CCL5, presentando una concentración relativa al control en BT-474.R del 46,17% (p-valor < 0,01) y en HCC1569 del 41,68 (p-valor < 0,01).

Además, se evaluó si la sensibilización a trastuzumab en la línea BT-474.R provocada por el silenciamiento de CCL5 era compensada con la adición de CCL5 exógeno (CCL5r). En este caso, se realizó en la línea BT-474.R silenciamiento de CCL5 y control a 7 días, incluyendo condición

de tratamiento con trastuzumab, tratamiento CCL5 exógeno (CCL5r) y combinación de ambos tratamientos (Figura 40). La condición de silenciamiento de CCL5 (siCCL5) en presencia de trastuzumab más CCL5r, presenta un porcentaje crecimiento significativamente mayor, p-valor 0,003 (73,08%), respecto a la condición siCCL5 tratada con trastuzumab (57,82%), considerándose resistente a trastuzumab, valor Δ GR de 1,1. Estos datos indican que un incremento de los niveles de CCL5 está implicado en la resistencia adquirida a trastuzumab.

Además, este experimento apoyó el experimento previo, obteniéndose la misma reversión de la resistencia a trastuzumab al silenciar CCL5 y tratar con trastuzumab.

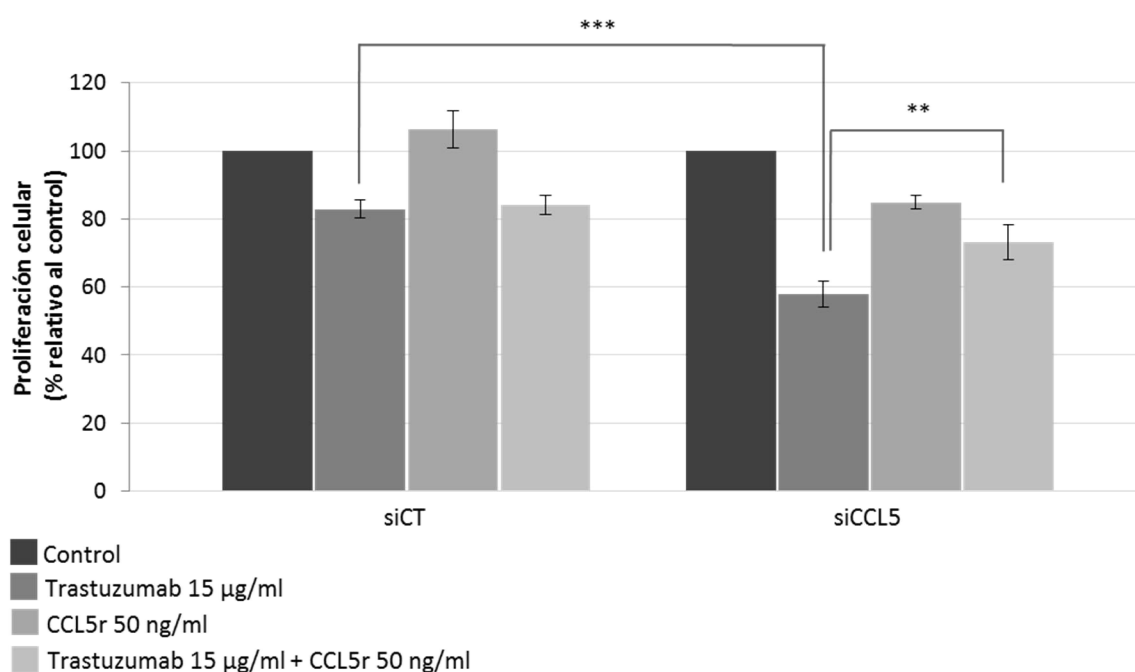


Figura 40. La adición de CCL5 exógeno (CCL5r) provoca un incremento significativo proliferación celular en las células BT-474.R con silenciamiento de CCL5 tratadas con trastuzumab 15 µg/ml a 7 días de tratamiento, p-valor 0,003. El silenciamiento de CCL5 provoca una disminución significativa de la proliferación celular en las células BT-474.R, p-valor 3,16E-08, revirtiendo la resistencia adquirida a trastuzumab.

4.1.3 Inhibición farmacológica de la actividad de CCL5

El fármaco maraviroc es un antagonista modulador alostérico negativo del receptor CCR5 que bloquea su activación, al impedir la unión de CCL5 con el receptor. Este fármaco está aprobado por la FDA y la EMEA para el tratamiento de pacientes con infección por VIH. En base a los resultados presentados en el apartado anterior, en los que se demuestra que CCL5 tiene implicación en la resistencia adquirida a trastuzumab, se evaluó el efecto provocado por

maraviroc en la modulación de la actividad de CCL5, impidiendo su unión con el receptor CCR5 [115].

4.1.3.1 Determinación de la concentración de tratamiento de maraviroc

Las líneas celulares BT-474, BT-474.R y HCC1569 se expusieron a distintas concentraciones de maraviroc. Se utilizó el ensayo MTS durante 96 horas para evaluar la viabilidad celular en respuesta al fármaco. Inicialmente, se testaron concentraciones de maraviroc desde 0,5 μ M hasta 50 μ M (Figura 41), según las referencias de trabajos previos. A concentraciones intermedias se observó que la viabilidad celular de las tres líneas es muy similar con valores comprendidos entre el 80-90%. Sin embargo, a la máxima concentración se observó una importante disminución de la viabilidad celular en BT-474, alcanzando valores de viabilidad del 53%, y menos acusada en BT-474.R con valores del 70%.

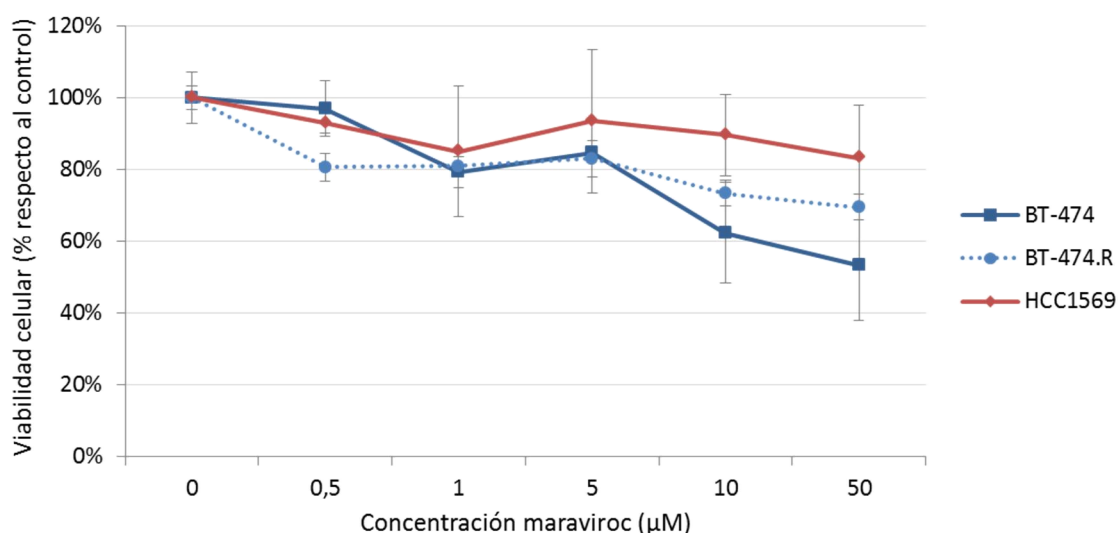


Figura 41. Efecto de la concentración de maraviroc durante 96 horas en viabilidad celular en las líneas BT-474, BT-474.R y HCC1569 medido mediante ensayo MTS en placa de 96 pocillos. Se observa una disminución de la viabilidad celular en BT-474 a 50 μ M, siendo menor en BT-474.R y HCC1569.

Esta disminución no fue suficiente para poder calcular la concentración máxima inhibitoria (IC50), dado que se trata de un fármaco que no provoca muerte celular pero que incide sobre la proliferación celular. Por tanto, se desarrollaron ensayos de proliferación celular a 7 días de tratamiento y se incrementó la concentración del fármaco a niveles de saturación de su actividad. La línea BT-474 que no presenta sobreexpresión de CCL5 y que por MTS se ha identificado que presenta una sensibilidad a maraviroc muy similar a la de las dos líneas resistentes a trastuzumab no se incluye en este experimento.

Para la valoración del efecto de maraviroc en las células BT-474.R y HCC1569 se seleccionaron las siguientes concentraciones del fármaco: 5, 10, 50, 100 y 200 μM , incluyendo una condición control sin maraviroc con vehículo (Figura 42). El conteo tras 7 días reveló que la exposición a maraviroc a altas concentraciones no provoca una inhibición significativa de la proliferación celular en ninguna de las dos líneas testadas. En base a estos experimentos se seleccionó como concentración de tratamiento en experimentos de combinatoria a 7 días, 10 μM de maraviroc, incrementando esta concentración hasta 50 μM para la valoración del efecto molecular del fármaco y de trastuzumab.

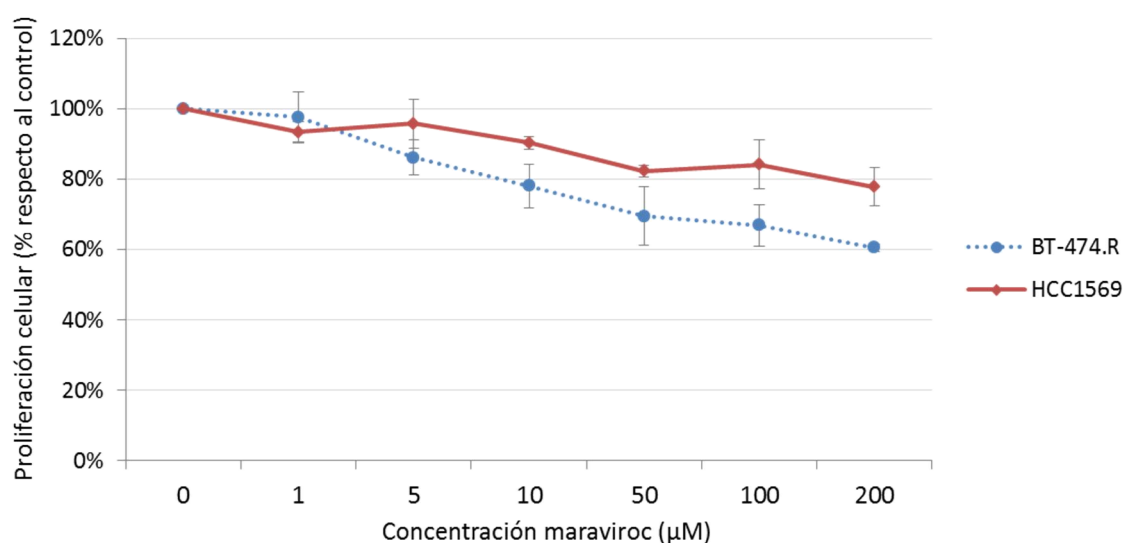


Figura 42. Efecto de la concentración de maraviroc en la proliferación celular durante 7 días en proliferación celular en las líneas BT-474.R y HCC1569. Se observa un mayor efecto en la disminución de la proliferación en BT-474.R, alcanzado valores del 61% en la concentración máxima, lo que se hace sensible a maraviroc a esta concentración. El efecto sobre HCC1569 es más moderado, alcanzado valores de proliferación celular en torno al 80% en las concentraciones más altas.

4.1.3.2 Efecto celular del tratamiento combinado de trastuzumab y maraviroc

Para corroborar la implicación de CCL5 en la resistencia adquirida a trastuzumab, se realizaron ensayos a 7 días de tratamiento de medida de proliferación celular con tratamiento con trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$, maraviroc 10 μM , y la combinación de ambos fármacos en las líneas BT-474.R y HCC1569 (Figura 43). Se observó que en BT-474.R, ambos tratamientos de forma individual no provocaban una inhibición de la proliferación. Sin embargo, el tratamiento combinado de trastuzumab más maraviroc provocó una disminución significativa de la proliferación celular (46,58 %), p -valor $<0,001$ respecto a la condición control y a las condiciones de los tratamientos de forma individual. El tratamiento con maraviroc, impidiendo la acción de CCL5, combinado con trastuzumab, revierte la resistencia adquirida en las células BT-474.R.

En la línea HCC1569 se observó que el tratamiento combinado de trastuzumab y maraviroc no provocó una disminución significativa de la proliferación, alcanzando valores del 84,53% respecto al 92,58% del tratamiento con trastuzumab, con un p-valor $> 0,05$ y un 88,84% del tratamiento con maraviroc.

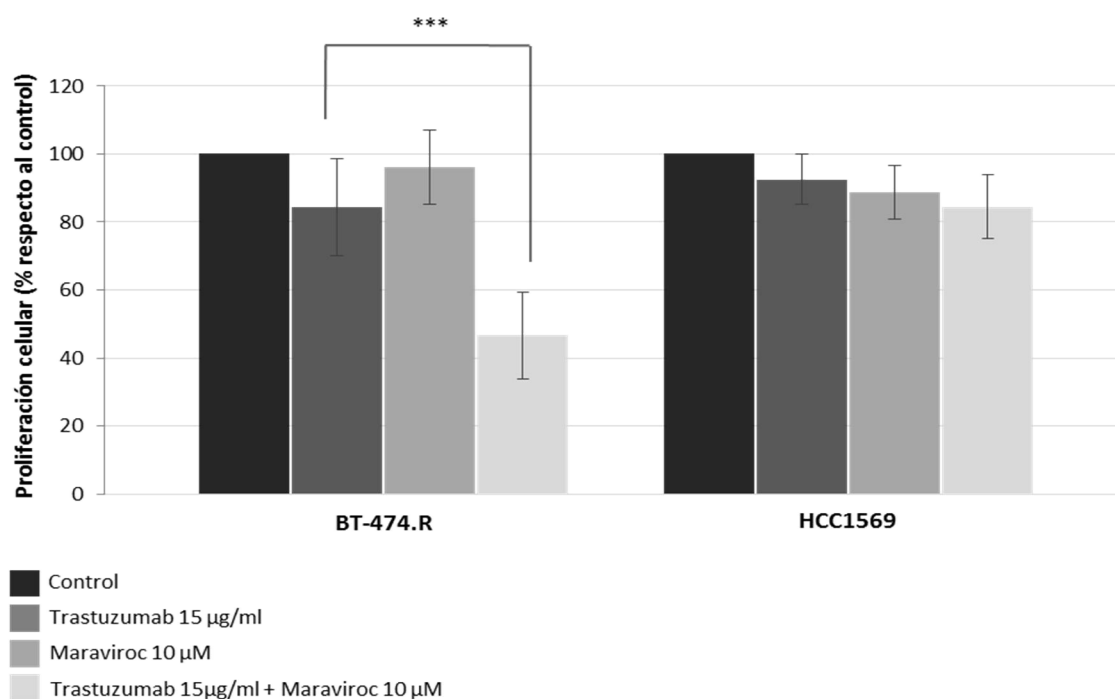


Figura 43. Efecto en la proliferación celular del tratamiento con maraviroc 50 µM, en combinación con trastuzumab 15 µg/ml en BT-474.R y HCC1569. El tratamiento combinado provoca una disminución significativa de la proliferación celular (p-valor 6,9E-09) en las células BT-474.R tratadas con maraviroc 10 µM y trastuzumab 15 µg/ml a 7 días de tratamiento, revirtiendo la resistencia adquirida a trastuzumab. El tratamiento combinado no provoca una disminución significativa de la proliferación celular en la línea HCC1569.

4.1.3.3 Efecto molecular del tratamiento combinado de trastuzumab y maraviroc

En base a al efecto en la proliferación celular que provoca el tratamiento combinado de trastuzumab y maraviroc, se midió su efecto molecular en las dos principales rutas implicadas en la transducción de señales del receptor HER2.

En primer lugar, se evaluó el efecto que provoca el tratamiento con trastuzumab a 24 horas en las líneas BT-474, BT-474.R y HCC1569, (Figura 44) observándose que las líneas BT-474 y HCC1569 presentan una mayor activación de ERK respecto a la línea BT-474.R. En condiciones de tratamiento con trastuzumab se observó una disminución de p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) en BT-474, mientras que los niveles de fosforilación de ERK no se ven afectados por el tratamiento con trastuzumab en BT-474.R y HCC1569. Este hecho indica que, en ambas líneas resistentes,

trastuzumab no es capaz de bloquear la activación de ERK. Además, destaca que la línea HCC1569 presenta un incremento de los niveles de AKT total y de p-AKT (Thr 308) respecto a los niveles detectados en las líneas BT-474 y BT-474.R. El tratamiento con trastuzumab provoca una disminución de los niveles de fosforilación p-AKT (Thr 308) y p-AKT (Ser 473), en BT-474 y BT-474.R, mientras que en HCC1569 el tratamiento con trastuzumab no afecta a ninguno de los residuos de fosforilación de AKT (Figura 44).

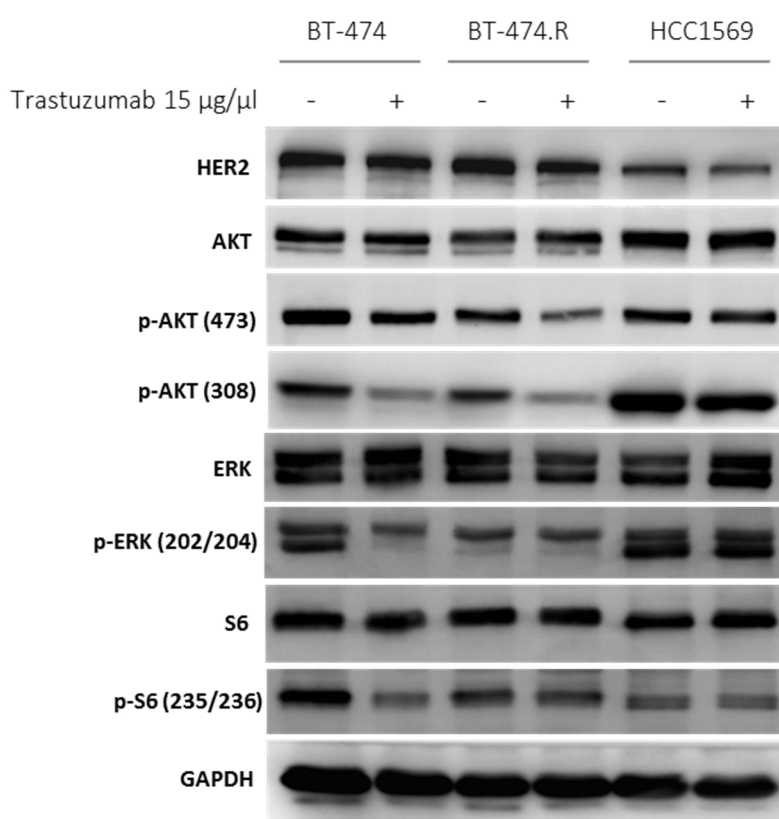


Figura 44. Análisis de inmunodetección realizado en las líneas BT-474, BT-474.R y HCC1569 en presencia y ausencia de trastuzumab 15 µg/ml durante 24 horas. Bajo un adecuado control de carga de GAPDH, se identificó que el tratamiento con trastuzumab no provoca disminución de la fosforilación de p-AKT (Thr 308) y p-AKT (Ser 473) en HCC1569; ni afecta a los niveles de fosforilación de p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) en BT-474.R y HCC1569.

En el análisis de inmunodetección tras 24 horas de tratamiento con trastuzumab, maraviroc y la combinación de ambos en BT-474.R (Figura 45) se observó que la combinación de trastuzumab con maraviroc provocó una importante disminución de los niveles de activación de p-ERK, que no se observó en el tratamiento único con maraviroc, al igual que trastuzumab. Esta combinación fue capaz revertir el efecto de insensibilidad de la ruta de señalización celular mediada por ERK a trastuzumab. Además, tanto el tratamiento único con maraviroc, como en combinación con trastuzumab, no provocó una disminución de los niveles de HER2. Del mismo

modo, la combinación tampoco provocó disminución de los niveles p-AKT (Thr 308), mientras que el tratamiento con maraviroc incrementa su fosforilación.

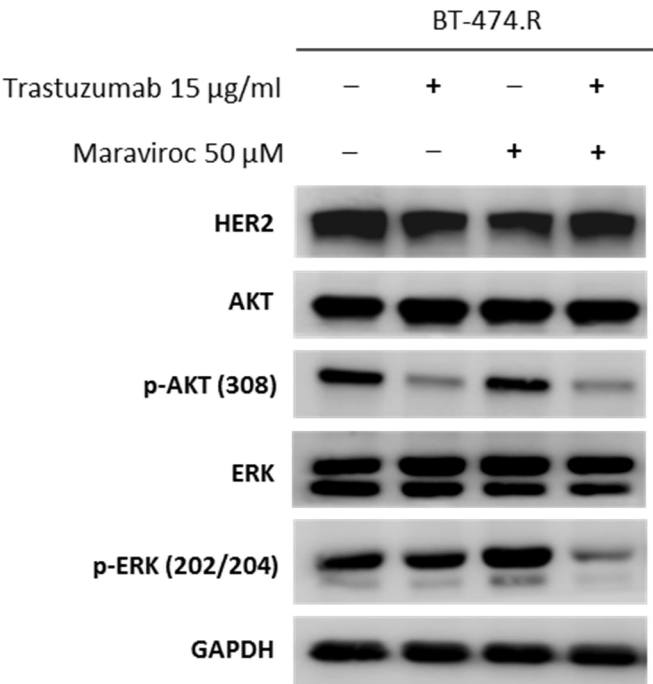


Figura 45. Inmunodetección realizado en la línea BT-474.R en condiciones de ausencia de tratamientos, tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml, maraviroc 50 µM y combinación de trastuzumab 15 µg/ml más maraviroc 50 µM durante 24 horas. Bajo un adecuado control de carga de GAPDH, se identificó que el tratamiento combinado de trastuzumab más maraviroc provoca una significativa disminución de la fosforilación de p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) que no es capaz de provocar el tratamiento único con trastuzumab, ni maraviroc.

La línea HCC1569 no se incluyó en el análisis del efecto molecular provocado por el tratamiento combinado de trastuzumab y maraviroc, de acuerdo los resultados obtenidos en los experimento de proliferación en presencia de trastuzumab más maraviroc y ante la evidencia de que presenta hiperactivación de la ruta PI3K/AKT/mTOR, mediada por la pérdida de expresión de PTEN [153].

4.1.4 Efecto del CCL5 exógeno en BT-474 sensible a trastuzumab

En base a los experimentos previos realizados en BT-474.R, en los que la sobreexpresión de CCL5 parece tener implicación el a resistencia adquirida a trastuzumab, se quiso estudiar el efecto en la sensibilidad a trastuzumab de la adición de CCL5 en la línea sensible a trastuzumab BT-474.

Mediante experimentos de proliferación celular a 7 días se analizó el efecto del trastuzumab en presencia de altos niveles de CCL5 exógeno en el medio de cultivo en BT-474. Se testaron las

siguientes condiciones, control, trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$, CCL5 recombinante 50 ng/ml , y la combinatoria de trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$ más CCL5 recombinante 50 ng/ml (Figura 46).

Se observó que el tratamiento con CCL5 recombinante no provoca un incremento de la resistencia a trastuzumab en BT-474. El tratamiento con trastuzumab provocó una reducción de la proliferación celular (28,65%) respecto a la condición control sin tratamiento, observándose el mismo efecto en la condición de tratamiento con trastuzumab y CCL5 recombinante (24,33%). Además, la adición al medio de CCL5 recombinante provoca un ligero incremento de la proliferación celular (108%) en referencia al control sin tratamiento.

Este resultado pone de manifiesto que la adicción exógena de CCL5 no es suficiente para provocar resistencia a trastuzumab en esta línea celular.

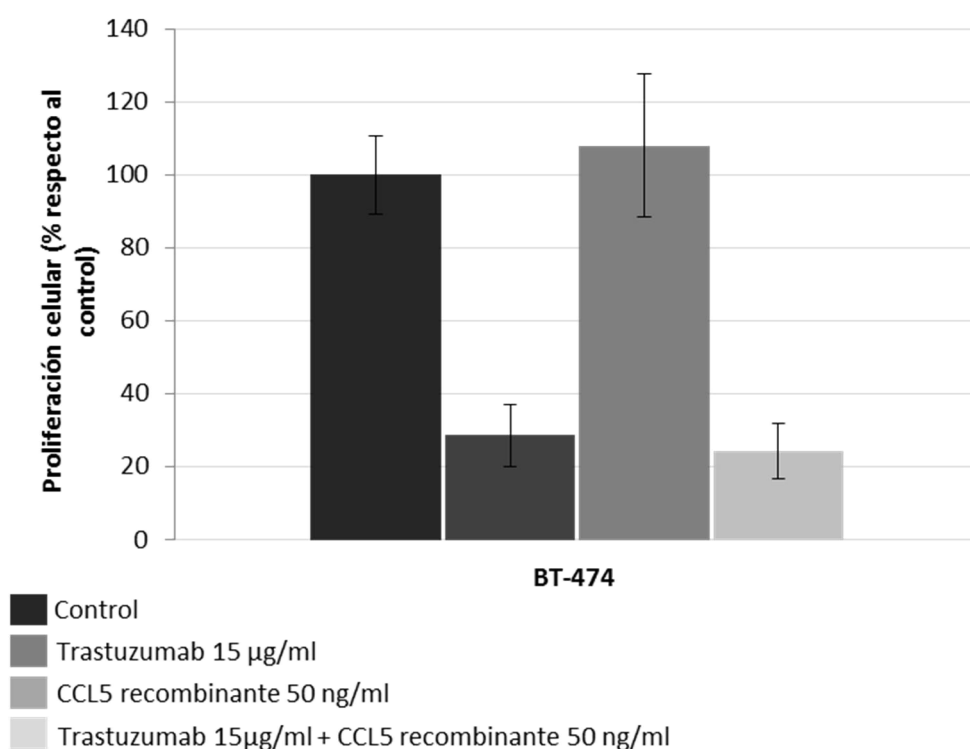


Figura 46. Efecto en la proliferación celular en la línea celular BT-474 a 7 días de tratamiento con trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$, CCL5 recombinante 50 ng/ml y trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$ más CCL5 recombinante 50 ng/ml . El tratamiento único con trastuzumab y el tratamiento combinado presentan el mismo porcentaje de proliferación, demostrando en ambos sensibilidad a trastuzumab.

4.2 Expresión de CCL5 en cáncer de mama HER2 positivo. Significado clínico

4.2.1 Optimización de la detección de CCL5

La optimización de la detección de CCL5 se realizó de acuerdo al algoritmo de Rimm para la validación de inmunohistoquímica [179]. En primer lugar, se valoró la expresión de CCL5 mediante WB en extractos de proteína, con una cantidad de CCL5 conocida determinada mediante qPCR, de las líneas BT-474, sin expresión de CCL5 y BT-474.R con incremento de los niveles de CCL5 respecto a BT-474. Únicamente se identificó banda específica del peso molecular esperado, 8 kDa, en los extractos de la línea BT-474.R, mientras que no se detectó banda específica en los extractos de BT-474 (Figura 47).

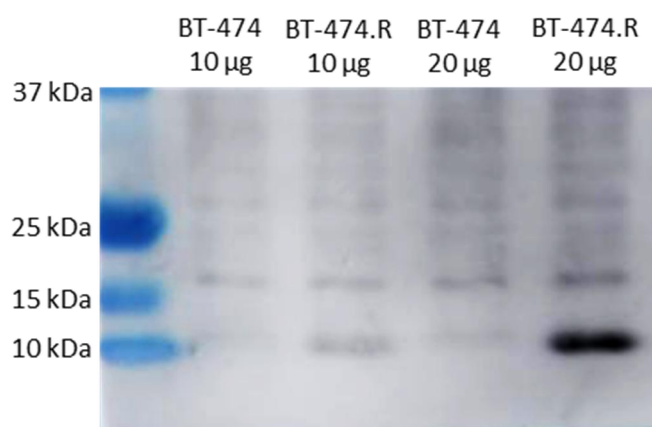


Figura 47. Análisis de inmunodetección de las líneas BT-474 y BT-474.R con diferentes cantidad de proteína total. Se observa de forma específica una banda de 10kDa en los carriles correspondiente a BT-474.R, línea celular con incremento de expresión de CCL5. En los carriles correspondientes a BT-474 no se observa banda específica al peso molecular esperado.

Después de confirmar la especificidad del anticuerpo, se evaluó su sensibilidad en inmunohistoquímica sobre *pellets* FFPE de las líneas BT-474 y BT-474.R, estableciendo un rango de diluciones: 1:20, 1:40, 1:100 y un control negativo, con ausencia de anticuerpo primario CCL5 (Figura 48). En la línea BT-474.R se detectó inmunotinción positiva nuclear y citoplasmática específica en las diluciones 1:40 y 1:100; sin detectarse tinción en el control negativo sin anticuerpo primario anti-CCL5; además, la dilución 1:20 presentó una tinción inespecífica difusa. En la línea BT-474 no se detectó inmunotinción específica en ninguna de las diluciones testadas, y la dilución 1:20 presentó una tinción ligera inespecífica. En base a estos resultados se determinó que la dilución óptima del anticuerpo anti-CCL5 era 1:40.

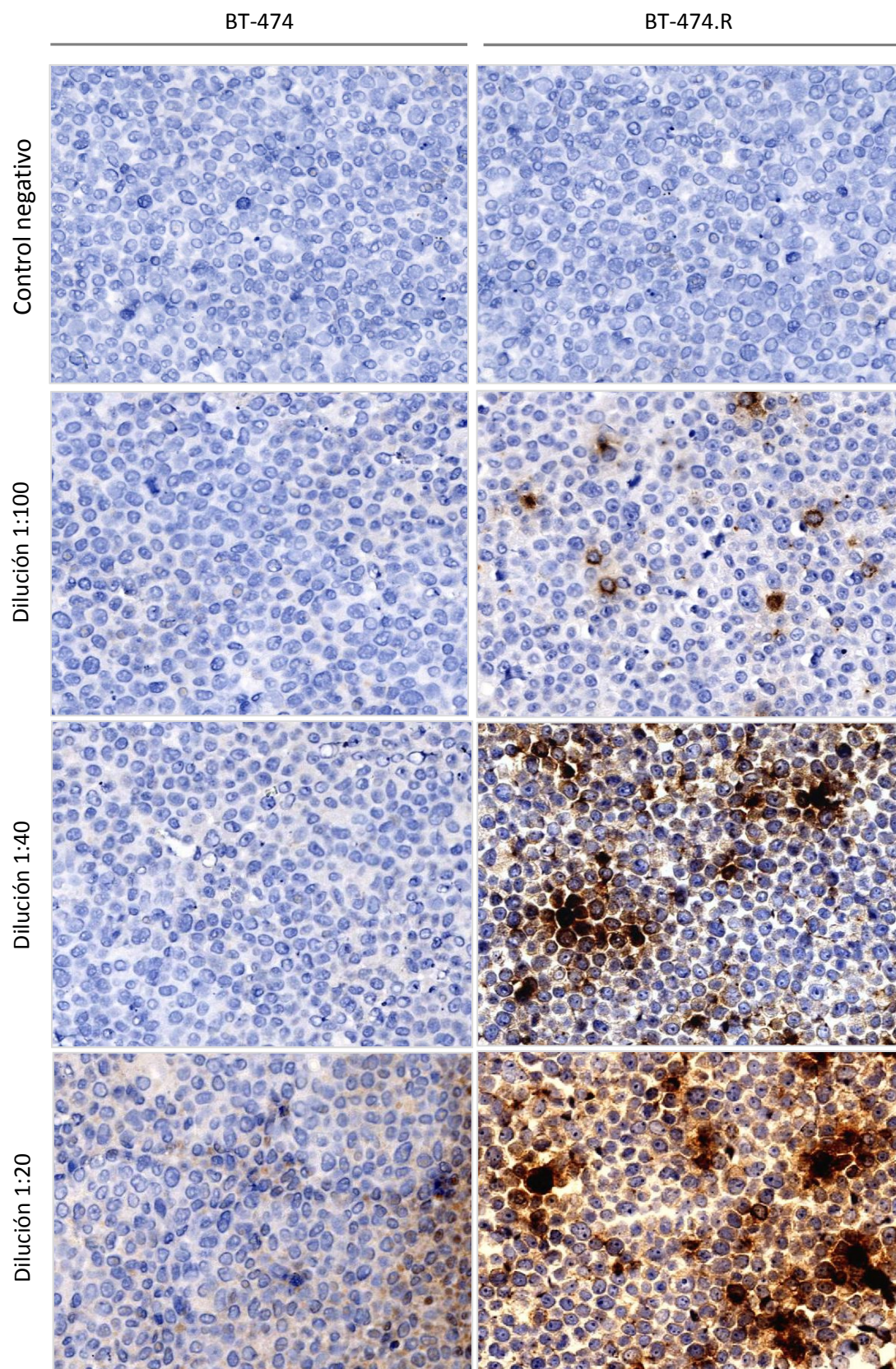


Figura 48. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica 200X reveladas con DAB, para el anticuerpo CCL5 sobre precipitados celulares FFPE de las líneas BT-474 y BT-474.R, a diferentes concentraciones de anticuerpo.

El valor de *H-score* de sobreexpresión de CCL5 se determinó mediante la *curva ROC* basado en el punto final de progresión, calculado el área bajo la curva (AUC) (Figura 49). Se consideró alta sobreexpresión de CCL5 un valor de *H-score* de 150, con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 100%.

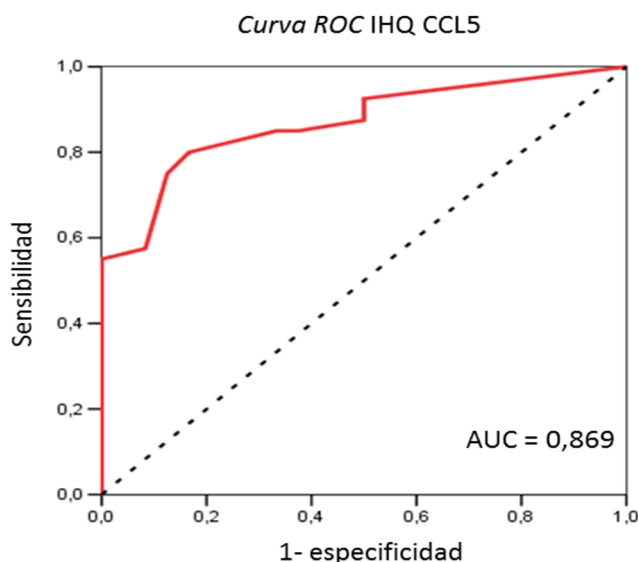


Figura 49. Curva ROC para la determinación del valor de *H-score* óptimo de sobreexpresión de CCL5. De acuerdo con el análisis de la *curva ROC* el *H-score* se estableció en 150 con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 100%. Este punto de corte se usó para definir la sobreexpresión de CCL5.

4.2.2 Patrones de expresión de CCL5 en muestras humanas

En las secciones de tejido de los tumores analizados se observó un patrón de expresión citoplasmática de CCL5 en células neoplásicas, de forma parcheada u homogénea, con una intensidad variable entre ligera y fuerte. El mismo patrón de tinción se reprodujo en las lesiones de carcinoma in situ incluidas en alguna de las muestras analizadas.

En tejido mamario normal adyacente al tumor no pudo constatarse expresión de CCL5 en las condiciones del ensayo optimizadas en este trabajo. De forma constante, y como era esperable, se detectaba expresión CCL5 en linfocitos y células plasmáticas presentes en el estroma tumoral y en el parénquima mamario adyacente. La expresión en estas células es moderada, parcheada y variable de un caso a otro en términos de proporción de células con tinción. Esta característica de expresión de CCL5 en células inflamatorias mononucleares se utilizó como control interno positivo en los casos evaluados en las distintas cohortes del estudio (Figura 50).

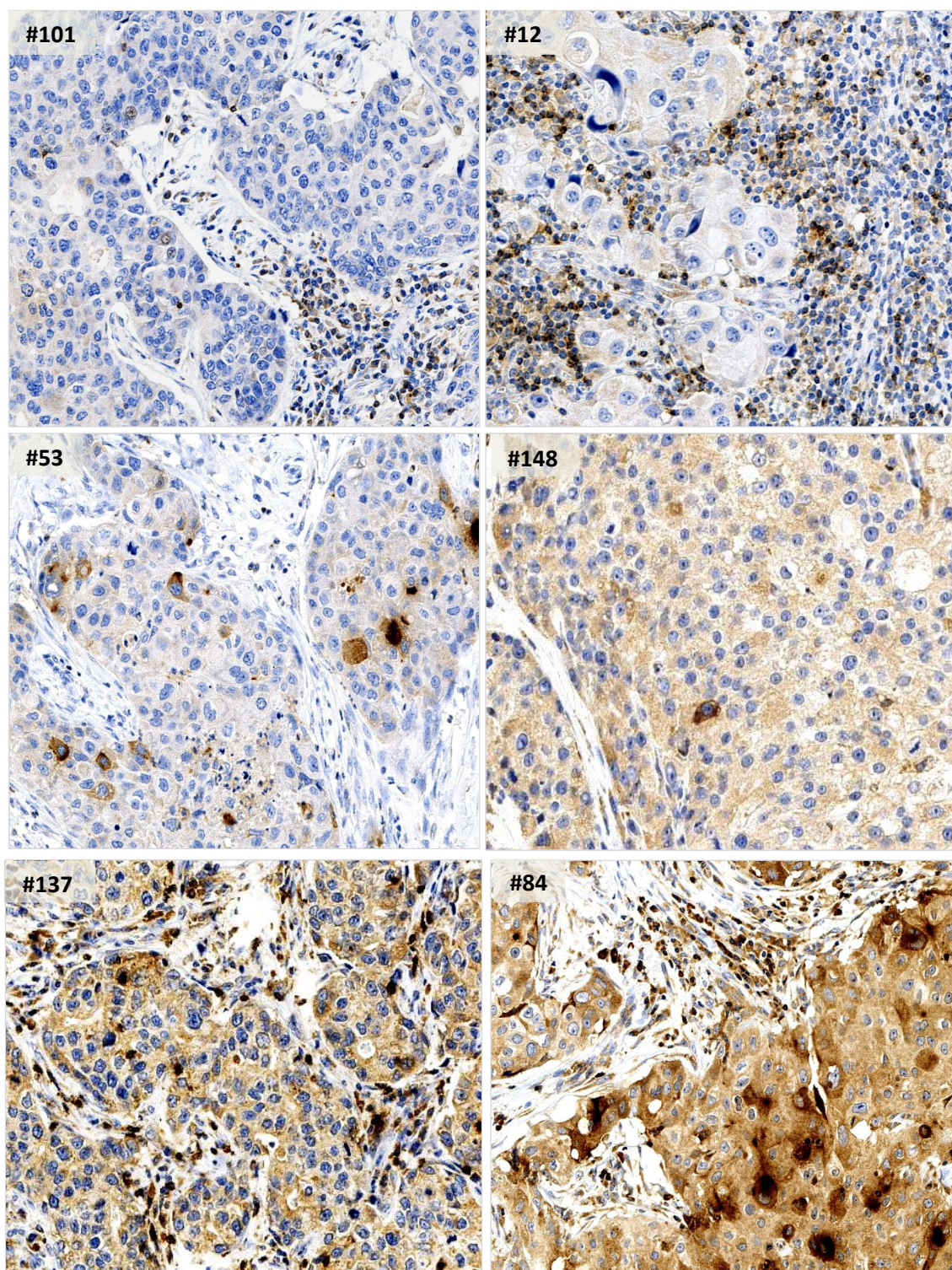


Figura 50. Imágenes representativas 200X reveladas con DAB, de la detección de CCL5 (1:40) mediante IHQ a partir de secciones de muestras FFPE de tumores de mama HER2 positivo. Las muestras #101 y #12 presentan una expresión débil de CCL5 en el componente tumoral infiltrante, detectándose expresión de CCL5 en el estroma. En la muestra #53 se detecta una tinción parcheada de CCL5 intermedia, observándose células con alta expresión de CCL5. Las muestras #148 y #137 presentan una tinción entre moderada e intensa en la totalidad del componente tumoral. En la muestra #84 se identifica una tinción de CCL5 intensa y parcheada.

4.2.3 Valor clínico de la expresión de CCL5 en cáncer de mama precoz HER2 positivo

La implicación de la sobreexpresión de CCL5 en la resistencia adquirida a trastuzumab observada en este modelo in vitro se estudió en una cohorte de muestras de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz HER2 positivo, todas ellas tratadas con trastuzumab en diferentes esquemas de tratamiento. Esta cohorte clínica se compuso de 146 casos de carcinoma de mama precoz. Además también se incluyó una pequeña cohorte de 14 muestras de sueros de pacientes con cáncer de mama HER2 positivos recogidas previamente al inicio del tratamiento con trastuzumab.

El análisis de expresión de los niveles de CCL5 en las muestras FFPE se realizó mediante inmunohistoquímica valorando la tinción en el componente tumoral. La determinación de la concentración de CCL5 en las muestras de suero se determinó mediante ensayo de ELISA.

4.2.3.1 Cohorte neoadyuvancia

En esta cohorte se incluyeron 64 muestras FFPE procedentes de biopsias diagnósticas de cáncer de mama precoz previas al inicio del tratamiento neoadyuvante de trastuzumab más quimioterapia, con una mediana de edad de 53 años. En el 32,8% (21/64) de los casos pertenecientes a este cohorte se detectaron altos niveles de expresión de CCL5, mientras que el 67,2% (43/64) presentó bajos niveles de expresión de CCL5 (Tabla 17).

Tabla 17. Características clínico-patológicas de las pacientes de cáncer de mama precoz HER2 positivas en tratamiento neoadyuvancia, y distribución de la expresión de CCL5 en relación a las características clínico-patológicas.

	Nº de casos (n= 64)	%	Baja expresión CCL5 (n=43)		Alta expresión CCL5 (n=21)		χ^2 p
			Nº	%	Nº	%	
Expresión de CCL5	64		43	67,2	21	32,8	
Edad							0,727
mediana (rango)	53 (36-87)						
35-60	47	73,4	31	72,1	16	76,2	
> 60	17	26,6	12	27,9	5	23,8	
Estatus hormonal							0,661
Pre-menopáusica	22	34,4	14	32,6	8	38,1	
Post-menopáusica	42	65,6	29	67,4	13	61,9	
Tipo morfológico							0,280
CDI	62	96,9	42	97,7	20	95,2	
CLI	1	1,6	1	2,3	0	0,0	
Otros	1	1,6	0	0,0	1	4,8	

Grado histológico Scarff-Bloom-Richarson							0,808
I	2	3,1	1	2,3	1	4,8	
II	35	54,7	23	53,5	12	57,1	
III	27	42,2	19	44,2	8	38,1	
Receptores de estrógenos							0,101
Negativo	21	32,8	17	39,5	4	19,0	
Positivo	43	67,2	26	60,5	17	81,0	
Receptores de progesteron							
Negativo	32	50,0	25	58,1	7	33,3	
Positivo	32	50,0	18	41,9	14	66,7	
Amplificación de HER2							0,884
No amplificado	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Amplificado	64	100,0	43	67,2	21	32,8	
Ki-67							0,734
mediana (rango)	40 (5-90)						
< 20	10	15,6	5	11,6	5	23,8	
≥ 20	54	84,4	37	86,0	17	81,0	
T							0,747
x	1	1,6	1	2,3	0	0,0	
1	2	3,1	2	4,7	0	0,0	
2	38	59,4	26	60,5	12	57,1	
3	19	29,7	11	25,6	8	38,1	
4	4	6,3	3	7,0	1	4,8	
N							0,284
x	5	7,8	4	9,3	1	4,8	
0	29	45,3	21	48,8	8	38,1	
1	26	40,6	17	39,5	9	42,9	
2	1	1,6	1	2,3	0	0,0	
3	3	4,7	0	0,0	3	14,3	
Respuesta patológica Sistema Miller & Payne							< 0,001
G1-G3	21	32,8	6	14,0	15	71,4	
G4	18	28,1	12	27,9	6	28,6	
G5	25	39,1	25	58,1	0	0,0	
Respuesta ganglionar							0,013
A	23	35,9	18	41,9	5	23,8	
B	6	9,4	2	4,7	4	19,0	
C	11	17,2	4	9,3	7	33,3	
D	24	37,5	19	44,2	5	23,8	
Respuesta patológica							< 0,001
No completa	40	62,5	19	44,2	21	100,0	
Completa	24	37,5	24	55,8	0	0,0	
Recaída							100,0
No	53	82,8	40	93,0	13	61,9	0,002
Si	11	17,2	3	7,0	8	38,1	

En rango de edad de la serie fue de 36-87, mayoritariamente con edades comprendidas entre los 35 y 60 años. La expresión de CCL5 no se correlacionó de forma significativa con estatus hormonal, tipo y grado histológico, receptores hormonales, proliferación o estadio (Tabla 17).

La expresión de CCL5 se correlacionó de forma significativa con la respuesta patológica al tratamiento neoadyuvante con trastuzumab más quimioterapia (Tabla 17, Figura 51 A). El 71,4% de los tumores sin evidencia de respuesta patológica (grado del sistema Miller & Payne G1-G3), presentaron una alta expresión de CCL5, mientras que ninguno de los tumores con respuesta tumoral completa (Miller & Payne G5) presentó alta expresión de CCL5. Además, también se detectó incremento de los niveles de CCL5 en el 28,6% de los tumores con respuesta casi completa (Miller & Payne G4) (p -valor $< 0,001$). Atendiendo al grado de repuesta ganglionar (Figura 51 B), la sobreexpresión de CCL5 se detectó en un 52,3% de los casos sin evidencia de respuesta al tratamiento (B y C). Mientras que en 5 casos de con ganglios linfáticos negativos (A) y 5 cosos con ganglios sin infiltración neoplásica residual (D), se detectaron altos niveles de CCL5 (p -valor = 0,013).

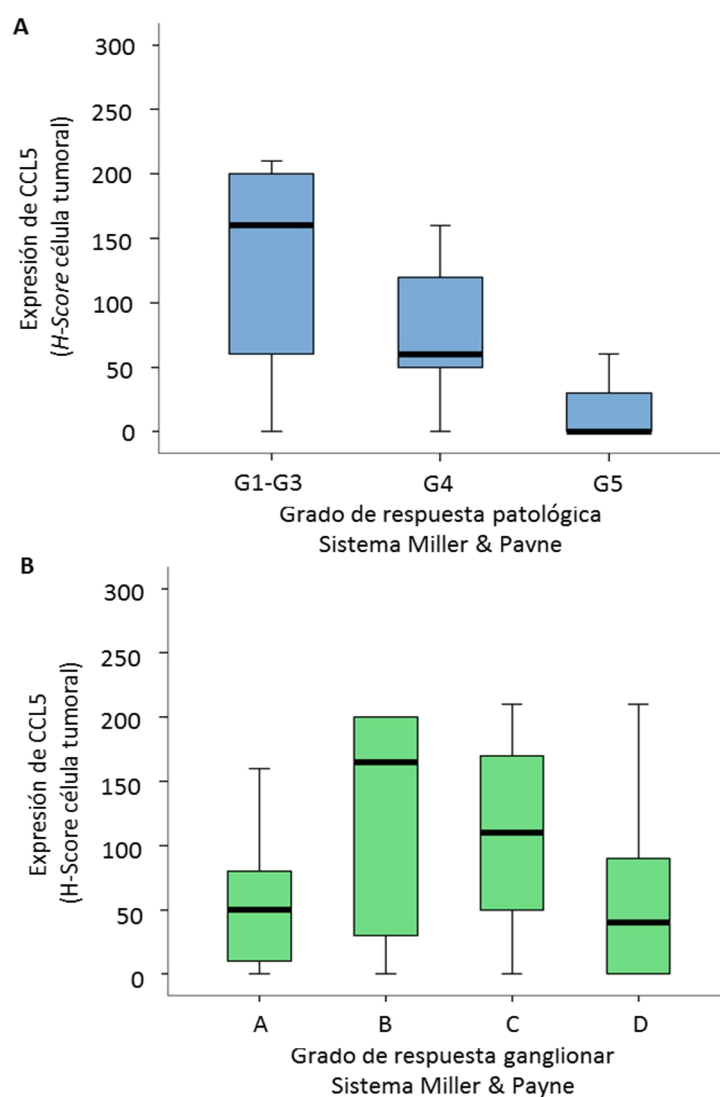


Figura 51. Gráfico de cajas de los niveles de expresión de CCL5 determinado en muestras de cáncer de mama precoz HER2 positivo en tratamiento neoadyuvante agrupado el grado de respuesta patológica tumoral sistema Miller & Payne (A) y grado de respuesta ganglionar (B).

Unificando la respuesta patológica en la mama y en la axila, se identificaron 24 casos con respuesta patológica completa, de los cuales, todos ellos presentaron bajos niveles de expresión de CCL5. Mientras, los 40 casos que no presentaron respuesta patológica completa, en el 52,5% (21/40) de ellos se identificaron altos niveles de CCL5 (p -valor $< 0,001$) (Tabla 17). Este dato indicó que un incremento de los niveles de expresión de CCL5 en el componente tumoral predice una peor respuesta al tratamiento con trastuzumab.

Además, la sobreexpresión de CCL5 se correlacionó con una mayor recaída de la enfermedad. De los 11 casos que presentaron recaída de la enfermedad, se detectó incremento de expresión en el 38,2% frente al 7% que presentaron bajos niveles de expresión (p -valor = 0,002) (Tabla 17).

El análisis de supervivencia en esta cohorte de pacientes demostró que la sobreexpresión de CCL5 se comporta como un factor de mal pronóstico de la enfermedad. La sobreexpresión de CCL5 en el componente tumoral se correlacionó significativamente con una menor supervivencia libre de enfermedad (p -valor = 0,001), con una mediana de supervivencia de 54 meses frente a 104 meses del grupo con baja expresión de CCL5 (Figura 52).

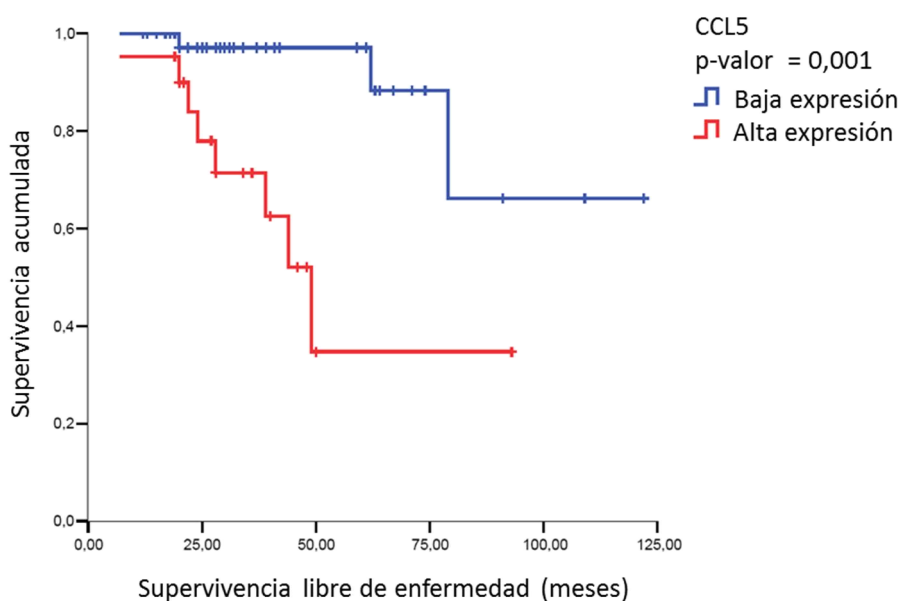


Figura 52. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad en la cohorte de 64 pacientes con cáncer de mama HER2 + en esquema de tratamiento neoadyuvante. La sobreexpresión de CCL5 se asoció a una menor supervivencia libre de enfermedad (p -valor = 0,001).

4.2.3.2 Valoración de la concentración de CCL5 en suero

A partir de una cohorte de 14 muestras de suero, procedente de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz HER positivo. Todas las muestras se obtuvieron en el momento del diagnóstico previamente al tratamiento con trastuzumab en esquema de neoadyuvancia.

La determinación del punto de corte óptimo para la concentración de CCL5 en suero, se realizó mediante una *curva ROC*, calculado el área bajo la curva (AUC) (Figura 53). El punto de corte establecido según los datos de la curva fue una concentración de CCL5 en suero ≥ 90 ng/ml, con una sensibilidad del 71% y una especificidad del 86%.

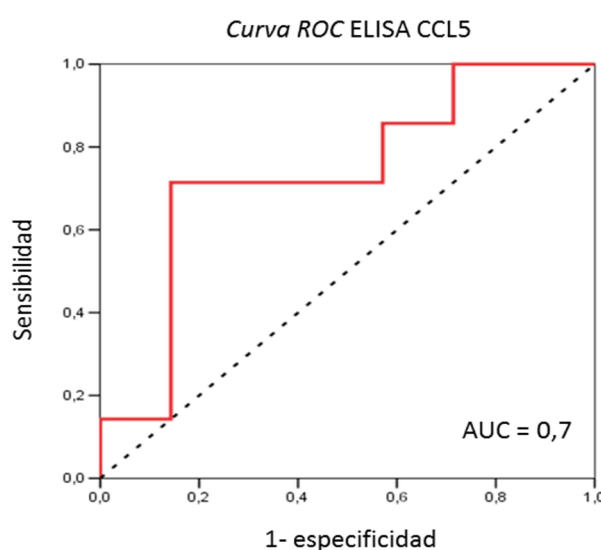


Figura 53. Curva ROC para la determinación del punto de corte óptimo para determinar la concentración de CCL5 en suero. De acuerdo con el análisis de la curva ROC el punto de corte se estableció en una concentración de CCL5 ≥ 90 ng/ml.

La determinación de la concentración de CCL5 en el suero, se realizó mediante ensayo de ELISA obteniendo datos de concentración en ng/ml en todas las muestras (rango: 25,67 ng/ml - 128,41 ng/ml) (Figura 54). El 42,85% (6/14) de los sueros analizados presentaron una alta concentración de CCL5, mientras que 57,14% (8/14) presentó baja concentración de CCL5, inferior al punto de corte.

La concentración de CCL5 en suero se correlacionó de manera significativa con el grado de respuesta patológica al tratamiento neoadyuvante con trastuzumab. El 75% de las pacientes con baja concentración de CCL5 en suero presentaron respuesta patológica completa, mientras que únicamente el 16,7% de las pacientes con alta concentración de CCL5 presentaron respuesta patológica completa (Tabla 18).

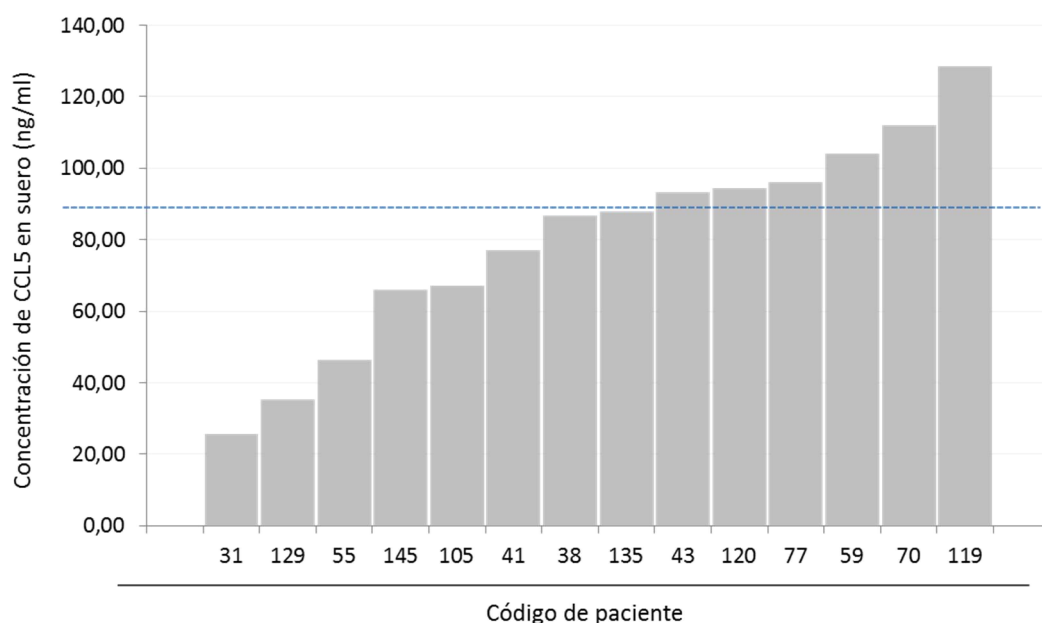


Figura 54. Gráfico de barras representativo de la concentración de CCL5 en ng/ml, determinada en muestras de suero de pacientes con cáncer de mama precoz obtenido previamente al tratamiento con trastuzumab. El punto de corte, representado por la línea de puntos azul, se estableció en ≥ 90 ng/ml, identificándose 6 pacientes con alta concentración de CCL5 en suero.

Tabla 18. Distribución de la concentración de CCL5 en relación a las características clínico-patológicas, en muestras de suero pacientes de cáncer de mama precoz HER2 positivas en tratamiento neoadyuvancia.

	Nº de casos	Baja concentración CCL5		Alta concentración de CCL5		χ^2 p
		Nº	%	Nº	%	
Concentración de CCL5	14	8	54,1	6	42,9	
Respuesta patológica	14	8		6		0,031
No completa	7	2	25,0	5	83,3	
Completa	7	6	75,0	1	16,7	

4.2.3.3 Cohorte adyuvancia

Esta cohorte se compone de 82 pacientes con cáncer de mama precoz previos al tratamiento con trastuzumab más quimioterapia, con una mediana de edad de 55 años, y un rango de edades desde 33 a 81 años. En este cohorte se detectó sobreexpresión de CCL5 en el 22% (18/82) de los casos estudiados. La distribución de la expresión de CCL5 en relación a las características clínico-patológicas de esta serie se recoge en la tabla 19.

La serie se caracterizó la presencia de casi una totalidad de muestras de tipo morfológico de carcinoma ductal infiltrante (81/82), todos ellos grados histológicos II y III, con expresión de

receptores de estrógenos en el 62,2% (51/82), y un Ki-67 alto en el 71,95% de los casos, sin existir evidencia significativa de asociación de CCL5 con ninguna de estas características clínicas. El 52,44% (43/82) de los casos presentó un pN0, no asociándose a CCL5. Finalmente, en el 35,37% (29/82) de las pacientes se observó recaída de la enfermedad, correlacionándose este parámetro de manera significativa con la expresión de CCL5 (p-valor < 0,001), identificándose altos niveles de CCL5 en el 72,2% (13/29) de casos con recaída (Tabla 19).

Tabla 19. Características clínico-patológicas de las pacientes de cáncer de mama precoz HER2 positivas en tratamiento adyuvancia, y distribución de la expresión de CCL5 en relación a las características clínico-patológicas.

	Nº de casos (n=82)	%	Baja expresión CCL5 (n=64)		Alta expresión CCL5 (n=18)		χ^2 p
			Nº	%	Nº	%	
Expresión de CCL5	82		64	78,0	18	22,0	
Edad							0,727
mediana (rango)	55 (33-81)						
35-60	47	57,32	31	48,4	16	88,9	
> 60	17	20,73	12	18,8	5	27,8	
Estatus hormonal							0,079
Pre-menopáusica	31	37,80	21	32,8	10	55,6	
Post-menopáusica	51	62,20	43	67,2	8	44,4	
Tipo morfológico							0,058
CDI	81	98,78	64	100,0	17	94,4	
CLI	1	1,22	0	0,0	1	5,6	
Grado histológico Scarff-Bloom-Richarson							0,255
I	0	0,00	0	0,0	0	0,0	
II	45	54,88	33	51,6	12	66,7	
III	37	45,12	31	48,4	6	33,3	
Receptores de estrógenos							0,915
Negativo	31	37,80	24	37,5	7	38,9	
Positivo	51	62,20	40	62,5	11	61,1	
Receptores de progesterona							0,515
Negativo	40	48,78	30	46,9	10	55,6	
Positivo	42	51,22	34	53,1	8	44,4	
Amplificación de HER2							0,754
No amplificado	0	0,00					
Amplificado	82	100,00	64	78,0	18	22,0	
Ki-67							0,533
mediana (rango)	30 (5-90)						
< 20	23	28,05	19	29,7	4	22,2	
≥ 20	59	71,95	45	70,3	14	77,8	

pT							0,744
1	33	40,24	25	39,1	8	44,4	
2	42	51,22	34	53,1	8	44,4	
3	5	6,10	4	6,3	1	5,6	
4	2	2,44	1	1,6	1	5,6	
pN							0,213
0	43	52,44	36	56,3	7	38,9	
1	18	21,95	14	21,9	4	22,2	
2	8	9,76	4	6,3	4	22,2	
3	13	15,85	10	15,6	3	16,7	
Recaída							< 0,001
No	53	64,63	48	75,0	5	27,8	
Si	29	35,37	16	25,0	13	72,2	

Analizando los niveles de CCL5 con la evolución de las pacientes, se evidenció que la presencia de un incremento de CCL5 en el componente tumoral se asoció significativamente a una menor supervivencia libre de enfermedad (p-valor < 0,001), con una mediana de supervivencia de estas pacientes de 44,36 meses, mientras que el grupo de pacientes con baja expresión de CCL5 presentó una mayor supervivencia, con una mediana de 92,73 meses (Figura 55).

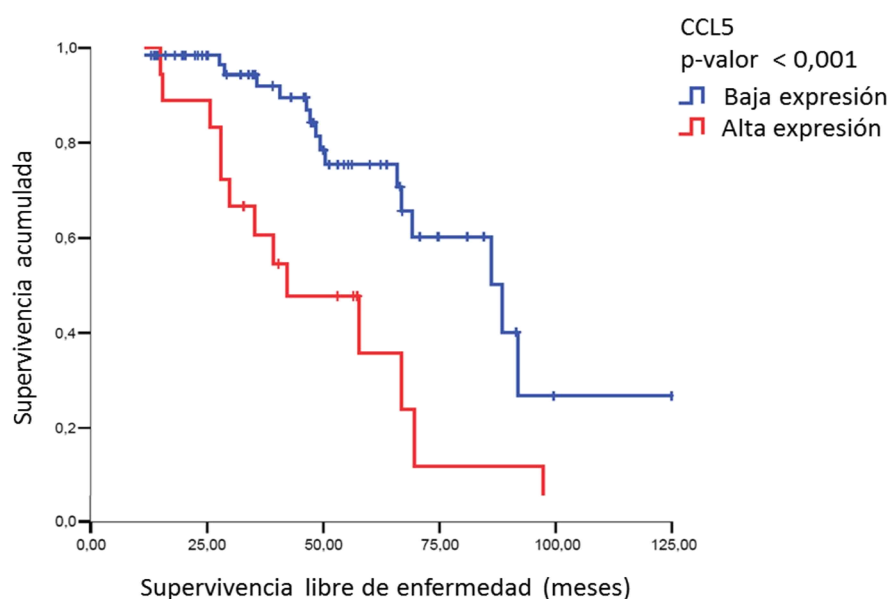


Figura 55. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad en la cohorte de 82 pacientes con cáncer de mama HER2 positivo en esquema de tratamiento adyuvante. La sobreexpresión de CCL5 se asoció a una menor supervivencia libre de enfermedad (p-valor < 0,001).

Finalmente, de manera conjunta, se correlacionaron los niveles de expresión de CCL5 con la evolución de las pacientes en el total de 146 casos de cáncer de mama precoz. De forma significativa el incremento de expresión de CCL5 en el componente tumoral se asoció a una menor supervivencia libre de enfermedad (p-valor < 0,01), con una mediana de supervivencia

de 29,37 meses frente a 41,5 meses (Figura 56 A) y a una menor supervivencia global (p-valor < 0,001) (Figura 56 B).

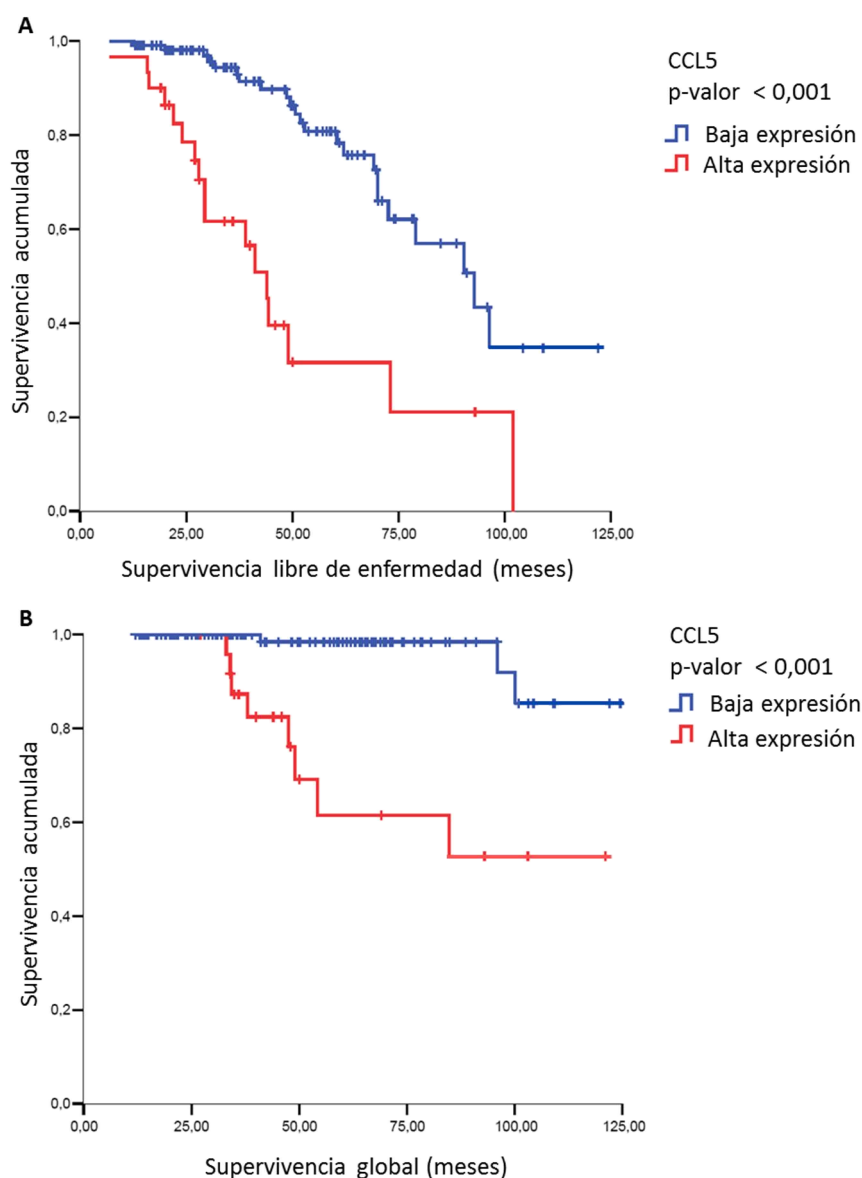


Figura 56. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad (A) y supervivencia global (B) en la cohorte de 146 pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo. La sobreexpresión de CCL5 se asoció a una menor supervivencia libre de enfermedad (p-valor < 0,001) y con una menor supervivencia global (p-valor < 0,001).

En el análisis multivariado de Cox, incluyendo los factores clínico-patológicos significativos en el estudio univariado, receptores de estrógenos y esquema de quimioterapia, junto la expresión de CCL5, se demostró que la sobreexpresión de CCL5 se comportó como un factor independiente de mal pronóstico en la serie de pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo analizada (p-valor < 0,001) (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis multivariado de la expresión de CCL5 y los factores clínico-patológicos. En rojo se resaltan los parámetros estadísticamente significativos, CCL5 se comporta como factor pronóstico independiente del resto de factores clínico-patológicos.

	Análisis multivariante			
	HR	95% CI		Significancia
		Inferior	Superior	
Receptores de estrógenos	2,51	0,682	9,3	0,166
Quimioterapia*				0,412
AC-Tx	0,54	0,11	2,64	0,45
A	0,51	0,11	2,46	0,40
TC	0,10	0,01	1,24	0,07
Tx	0,225	0,021	2,4	0,217
Expresión de CCL5	13,62	3,38	54,85	< 0,001

* AC-Tx: Antraciclinas-Ciclofosfamida-Taxanos
A: Antraciclinas
TC: Taxanos- Ciclofosfamida
Tx: Taxanos

4.2.4 Valor clínico de la expresión de CCL5 en cáncer de mama metastásico HER2 positivo

También se evaluó el efecto de la sobreexpresión de CCL5 en cáncer de mama avanzado HER2 positivo, a partir de una cohorte de 57 pacientes con muestras previas a la administración de trastuzumab por su enfermedad metastásica.

La mediana de edad fue de 50 años, con un rango 32-86. La sobreexpresión de CCL5 se detectó en el 22% (20/57) de las muestras tumorales. En la tabla 21 se recogen las características clínico-patológicas y la distribución de la expresión de CCL5 en relación a estos parámetros.

La expresión de CCL5 estaba balanceada según el estado hormonal, tipo histológico, receptores hormonales y proliferación y en ningún caso la expresión de CCL5 se asoció con estas características clínico-patológicas.

Tabla 21. Características clínico-patológicas de las pacientes de cáncer de mama HER2 positivas metastásicas, y distribución de la expresión de CCL5 en relación a las características clínico-patológicas.

	Nº de casos (n=57)	%	Baja expresión de CCL5 (n=37)		Alta expresión de CCL5 (n=18)		χ² p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Expresión de CCL5	57		37	78,0	20	22,0	
Edad							0,727
mediana (rango)	50 (32-86)						
35-60		0,0		0,0		0,0	
> 60		0,0		0,0		0,0	
Estatus hormonal							0,227
Pre-menopáusica	29	50,9	21	56,8	8	40,0	
Post-menopáusica	28	49,1	16	43,2	12	60,0	
Tipo morfológico							0,458
CDI	56	98,2	36	97,3	20	100,0	
CLI	1	1,8	1	2,7	0	0,0	
Grado histológico Scarff-Bloom-Richarson							0,377
G1	1	1,8	0	0,0	1	5,0	
G2	37	64,9	24	64,9	13	65,0	
G3	19	33,3	13	35,1	6	30,0	
Receptores de estrógenos							0,792
Negativo	30	52,6	19	51,4	11	55,0	
Positivo	27	47,4	18	48,6	9	45,0	
Receptores de progesterona			37				0,170
Negativo	38	66,7	27	73,0	11	55,0	
Positivo	19	33,3	10	27,0	9	45,0	
Amplificación de HER2							0,983
No amplificado	0	0,0					
Amplificado	57	100,0	37	78,0	20	22,0	
Ki-67							0,710
mediana (rango)	25 (5-90)						
< 20	10	17,5	7	18,9	3	15,0	
≥ 20	47	82,5	30	81,1	17	85,0	
Progresión							0,118
No	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Si	57	100,0	37	100,0	20	100,0	
Muerte							0,024
No	38	66,7	29	78,4	10	50,0	
Si	19	33,3	9	24,3	10	50,0	

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en esta cohorte demostraron que la sobreexpresión de CCL5, no se asocia a una menor supervivencia libre de progresión (p-valor = 0,153) con una mediana de 31 meses frente a 36 meses en los pacientes con bajos niveles de CCL5. Sin embargo, el incremento de la expresión de CCL5 si se asoció significativamente con una menor supervivencia global en este serie (p-valor = 0,024), con una mediana de supervivencia global de 55 meses frente a 70,9 meses (Figura 57 A y B).

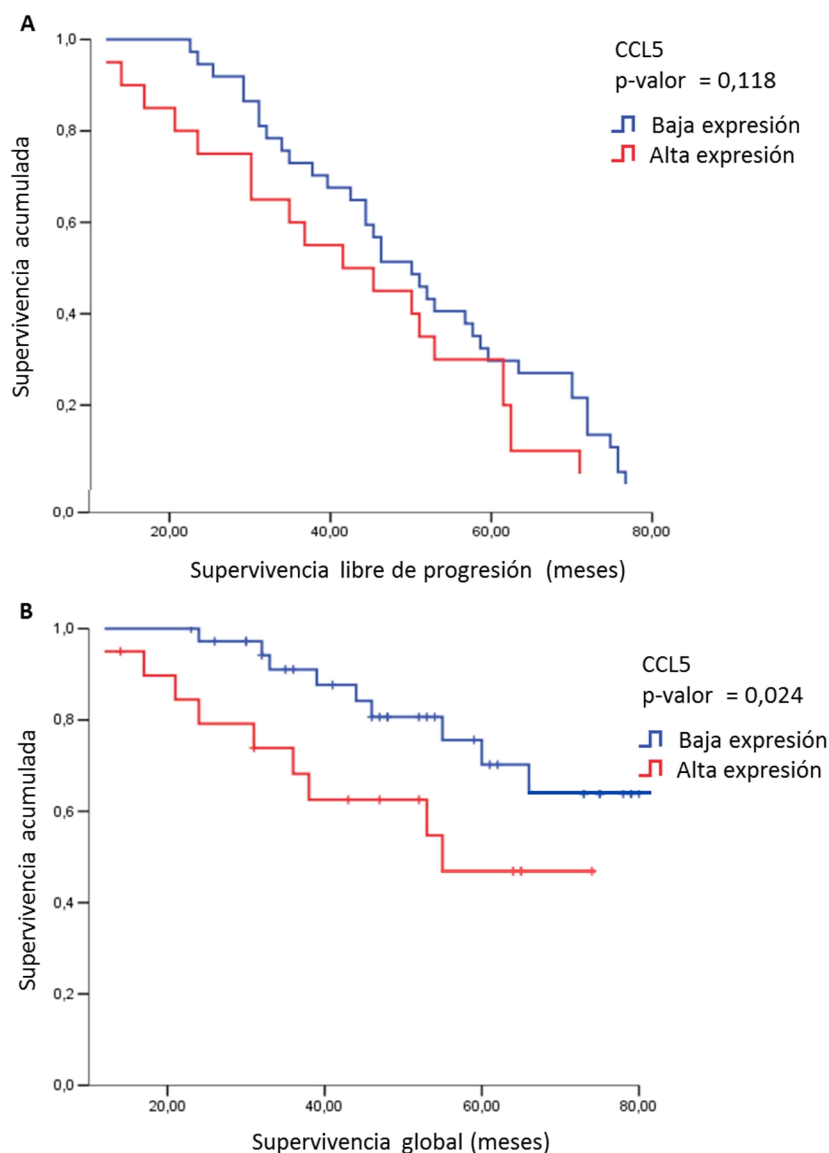


Figura 57. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de progresión (A) y supervivencia global (B) en la cohorte de 57 pacientes con cáncer de mama avanzado HER2 positivo. La sobreexpresión de CCL5 se asoció con una menor supervivencia global (p-valor = 0,024), pero no a una menor supervivencia libre de progresión (p-valor = 0,118).

4.2.5 Modulación de CCL5 en la historia natural de la enfermedad

La valoración de la modulación de la expresión de CCL5 en respuesta a la exposición al tratamiento con trastuzumab se realizó a partir de una cohorte de 44 pacientes con muestras pareadas, de las que se disponía de muestra previa a tratamiento con trastuzumab y muestras obtenidas tras la exposición al tratamiento. Del total de muestras pareadas de esta serie, 25 parejas correspondían a la cohorte de pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo tratadas en esquema de neoadyuvancia, y la muestra pre-tratamiento correspondía a la biopsia diagnóstica, y la muestra post-tratamiento a la pieza quirúrgica.

Tras la valoración de los niveles de expresión de CCL5 en estas muestras, se determinó de forma significativa que el 40% (10/25) (p-valor = 0,022) de las muestras post-tratamiento experimentaba un incremento de la expresión de CCL5 en el componente tumoral respecto a sus muestras pre-tratamiento, mientras que 28% (7/25) de las muestras después del tratamiento presentaron niveles de CCL5 inferiores a los determinados en su muestra previa al tratamiento. Además, 8 casos no presentaron modificación de la expresión de CCL5 entre las muestras pre y post-tratamiento (Figura 58). De forma significativa la exposición continuada a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo provocó un incremento de expresión de CCL5.

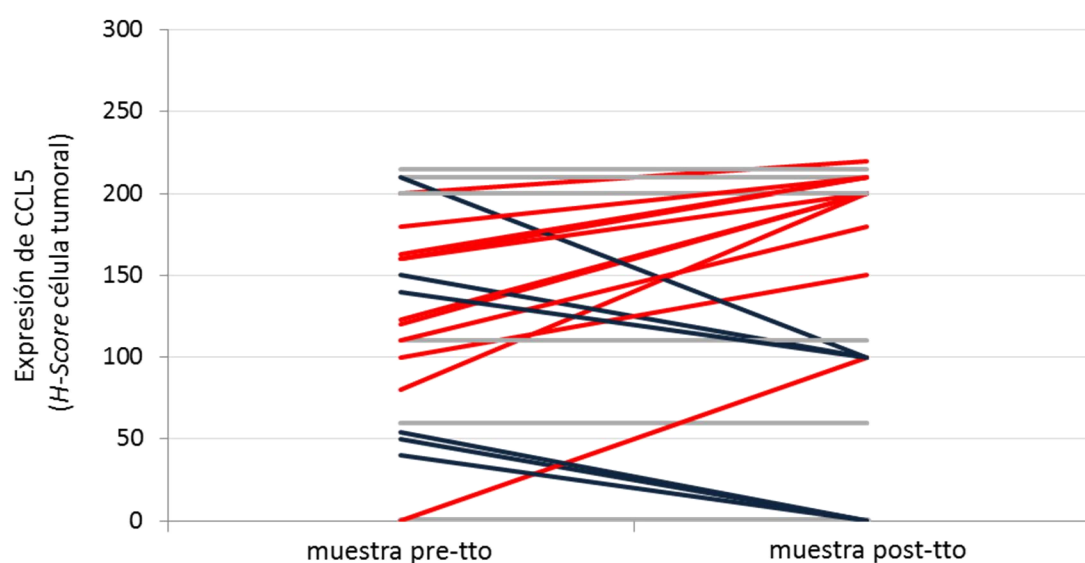


Figura 58. Imagen gráfica representativa de los niveles de expresión de CCL5 en muestras pre-tratamiento (pre-tto) y sus correspondientes muestras post-tratamiento (post-tto) de 25 muestras pareadas de cáncer de mama precoz HER2 positivo en esquema de neoadyuvancia. Las líneas rojas corresponden a los tumores que experimentan un incremento de expresión de CCL5 en la muestras post-tratamiento (10/25), la línea azul corresponde a las muestras que disminuyen la expresión de CCL5 respecto a la muestra pre-tratamiento (7/25), y la línea gris corresponde a las muestras pareadas que no experimentan modificación de la expresión de CCL5 (8/25).

Además, del total de 203 casos estudiados distribuidos en las tres cohortes de pacientes analizadas, se seleccionaron 19 casos en los que se detectó progresión de la enfermedad durante el tratamiento convencional de quimioterapia más trastuzumab y en los cuales se disponía de muestra diagnóstica previa al inicio del tratamiento con trastuzumab y muestra representativa de la lesión metastásica posterior el tratamiento con trastuzumab.

El análisis de la expresión de CCL5 en el componente tumoral en esta serie evidenció de manera estadísticamente significativa que el 57,89% (11/19) (p-valor = 0,012) de las muestras post-

tratamiento presentaron un incremento de la expresión de CCL5 respecto a la expresión determinada en muestras diagnósticas previa exposición al fármaco. Además, en el 15,78% (3/19) se observó una disminución de la expresión de CCL5 tras el tratamiento con trastuzumab respecto a los niveles iniciales. En esta serie, únicamente se identificaron 5 parejas, todas ellas con valor *H-score* de CCL5 igual a 0, en las que la expresión se mantuvo estable con el tratamiento (Figura 59).

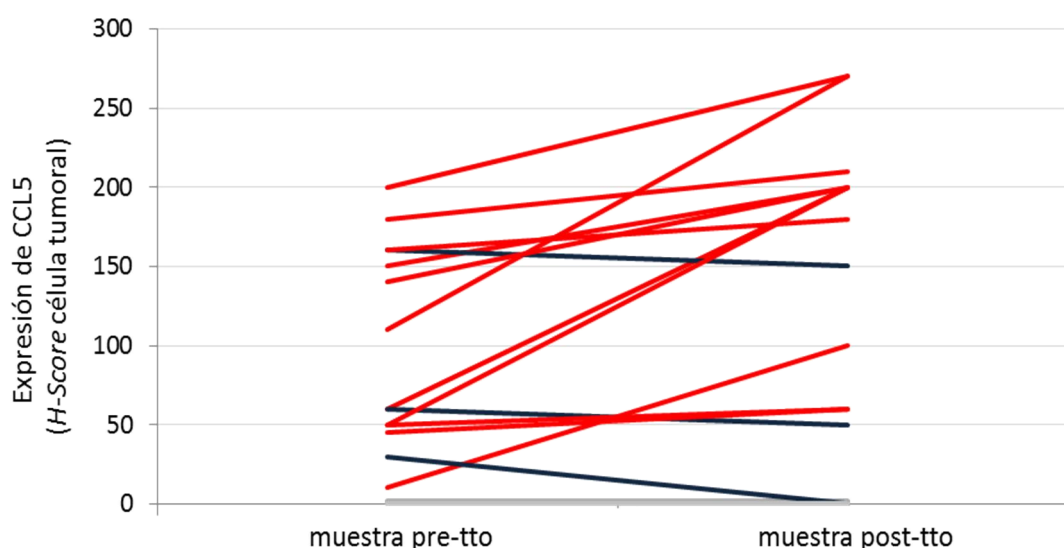


Figura 59. Imagen representativa de los niveles de expresión de CCL5 en muestras pre-tratamiento (pre-tto) y sus correspondientes muestras post-tratamiento (post-tto) de 19 muestras pareadas de cáncer de mama HER2 positivo. Las líneas rojas corresponden a los tumores que experimentan un incremento de expresión de CCL5 en la muestras post-tratamiento (11/19), la línea azul corresponde a las muestras que disminuyen la expresión de CCL5 respecto a la muestra pre-tratamiento (3/19), y la línea gris corresponde a las muestras pareadas que no experimentan modificación de la expresión de CCL5 (5/19).

4.2.6 Incidencia de las quimioquinas en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo

Se analizaron los niveles de expresión de CCL5 en una serie de 182 pacientes cáncer de mama HER2 positivo, obtenidos a partir de datos disponibles en bases públicas (The Cancer Genome Atlas, TCGA). Se correlacionó la expresión de CCL5 con la supervivencia global. Aunque, sin llegar a ser significativo, existe una tendencia de asociación de la sobreexpresión de CCL5 con peor supervivencia global (p-valor 0,069) (Figura 60). También se estudió la expresión del receptor más frecuente de unión de CCL5, CCR5, observándose una tendencia a asociarse con peor pronóstico de forma no significativa con supervivencia global (p-valor 0,086). Dado este resultado, se estudió la correlación con el resto de receptores a los que en menor medida se une CCL5 (CCR1, CCR2, CCR3 y CCR4), y en este caso, desatacó que el incremento de expresión

de CCR3 se correlacionó de forma significativa, p-valor 0,038, con una menor supervivencia global en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo (Figura 60).

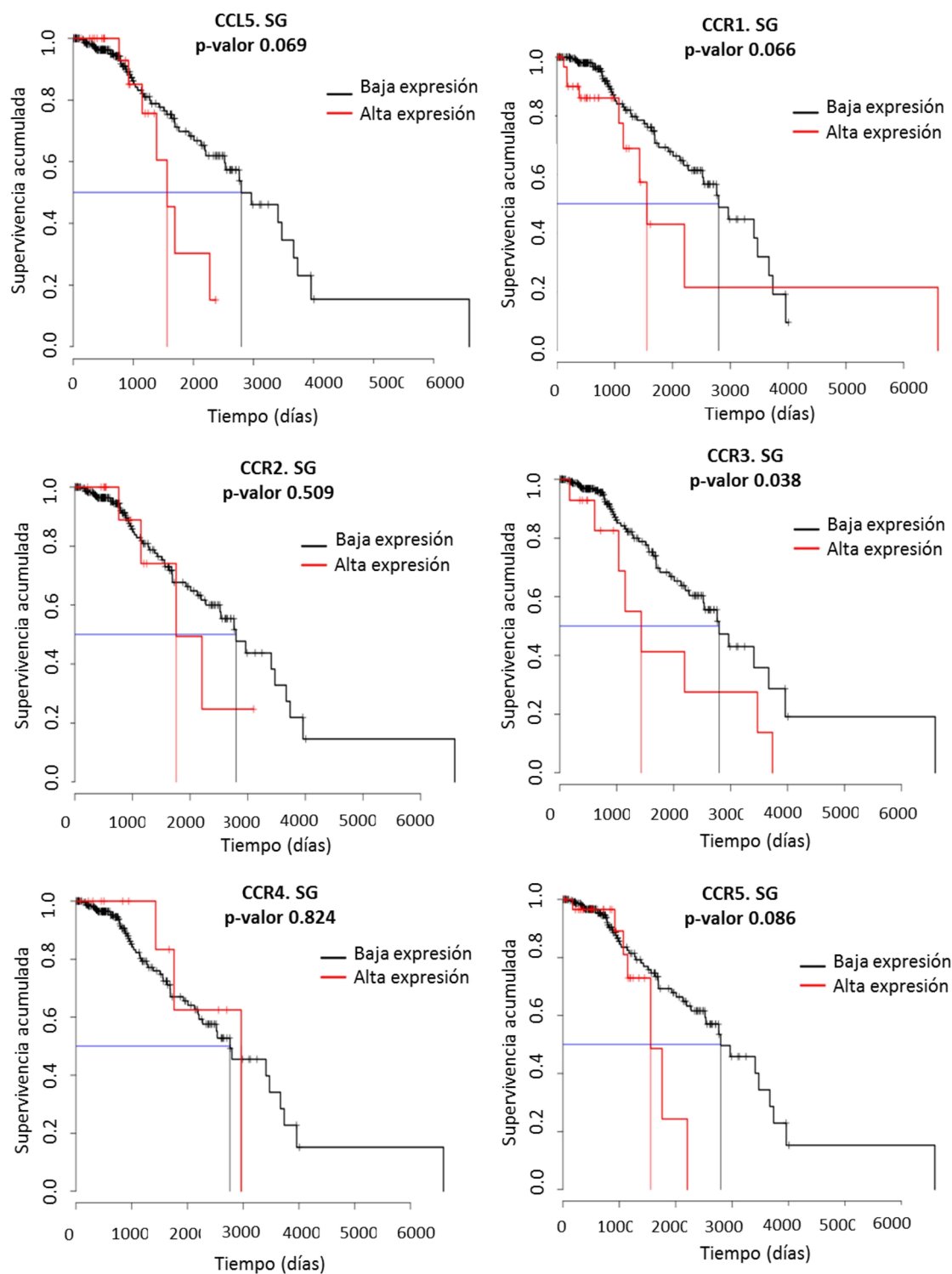


Figura 60. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia global en la cohorte de pacientes con cáncer de mama HER2 + de la base de datos pública TCGA. Únicamente, el incremento de expresión de CCR3 se asocia de forma estadísticamente significativa a una menor supervivencia global, p-valor = 0,038.

5. Terapias combinada trastuzumab e inhibidores de la ruta de señalización celular PI3K/AKT/mTOR

La activación constitutiva de la vía de señalización celular PI3K/AKT/mTOR se ha descrito como una de la principales causas de resistencia al tratamiento con trastuzumab, tanto resistencia primaria como adquirida, en cáncer de mama HER2 positivo. Este hecho ha puesto de manifiesto el posible beneficio del tratamiento con inhibidores de esta ruta como everolimus, BEZ235 e INK128, en terapia combinada con trastuzumab. Esta combinación de tratamiento podría presentar la capacidad de revertir la resistencia a trastuzumab en modelos celulares con resistencia primaria y con resistencia adquirida a trastuzumab.

5.1 Determinación de la IC50 de inhibidores de la ruta PI3K/AKT/mTOR

Se ha testado la sensibilidad de las líneas celulares a tres fármacos inhibidores de la ruta PI3K/AKT/mTOR, everolimus, un inhibidor análogo del complejo mTORC1; BEZ235, inhibidor dual de PI3K y mTORC1; e INK128 inhibidor selectivo de mTORC1 y mTORC2. Para establecer las condiciones de tratamiento y la concentración de cada uno de los fármacos, se realizaron estudios de proliferación celular a 7 días de tratamiento con concentraciones crecientes de los tres inhibidores de acuerdo a lo descrito en la literatura [128,180–184] en las 4 líneas sensibles a trastuzumab y sus correspondientes líneas con resistencia adquirida generadas y en dos de las líneas con resistencia primaria, HCC1954 y JIMT1 (Figuras 61, 62, 63).

El estudio de sensibilidad a everolimus demostró que todas las líneas presentan sensibilidad al tratamiento a altas concentraciones. Además, destacó que JIMT1 es muy sensible a este fármaco, disminuyendo su proliferación celular a más del 50% a 1 nM, y que AU565.R es más sensible al tratamiento que su parental sensible.

Everolimus (IC50)

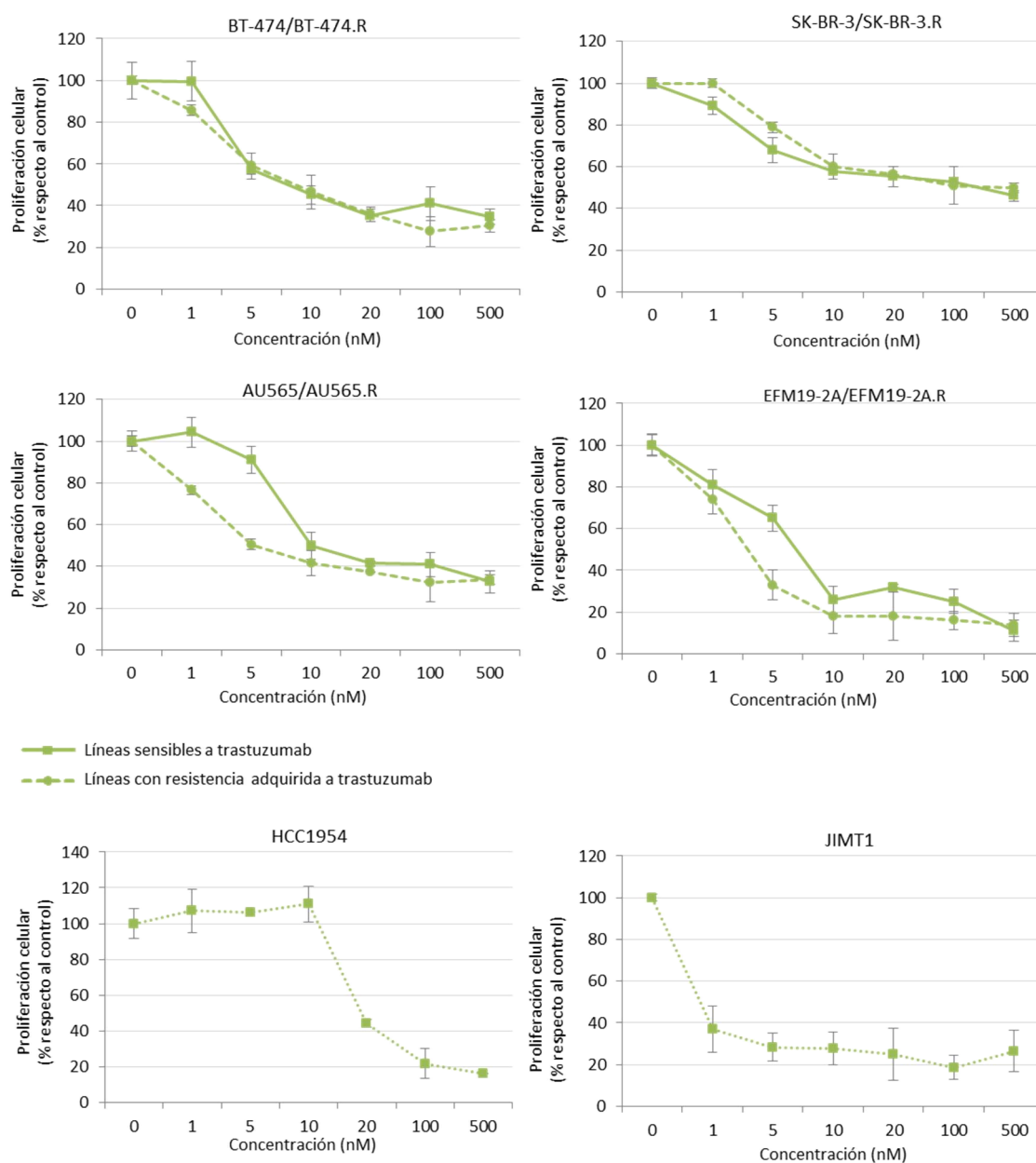


Figura 61. Efecto de la concentración creciente de everolimus durante 7 días de tratamiento en las líneas BT-474, BT-474.R, SK-BR-3, SK-BR-.R, AU565, AU565.R, EFM19-2A, EFM19-2A.R, HCC1954 y JIMT.

La determinación de la sensibilidad a BEZ235 evidenció que todas las líneas tienen un comportamiento muy similar al tratamiento, y únicamente la línea SK-BR-3.R presentó una mayor sensibilidad a este fármaco respecto de su línea parental.

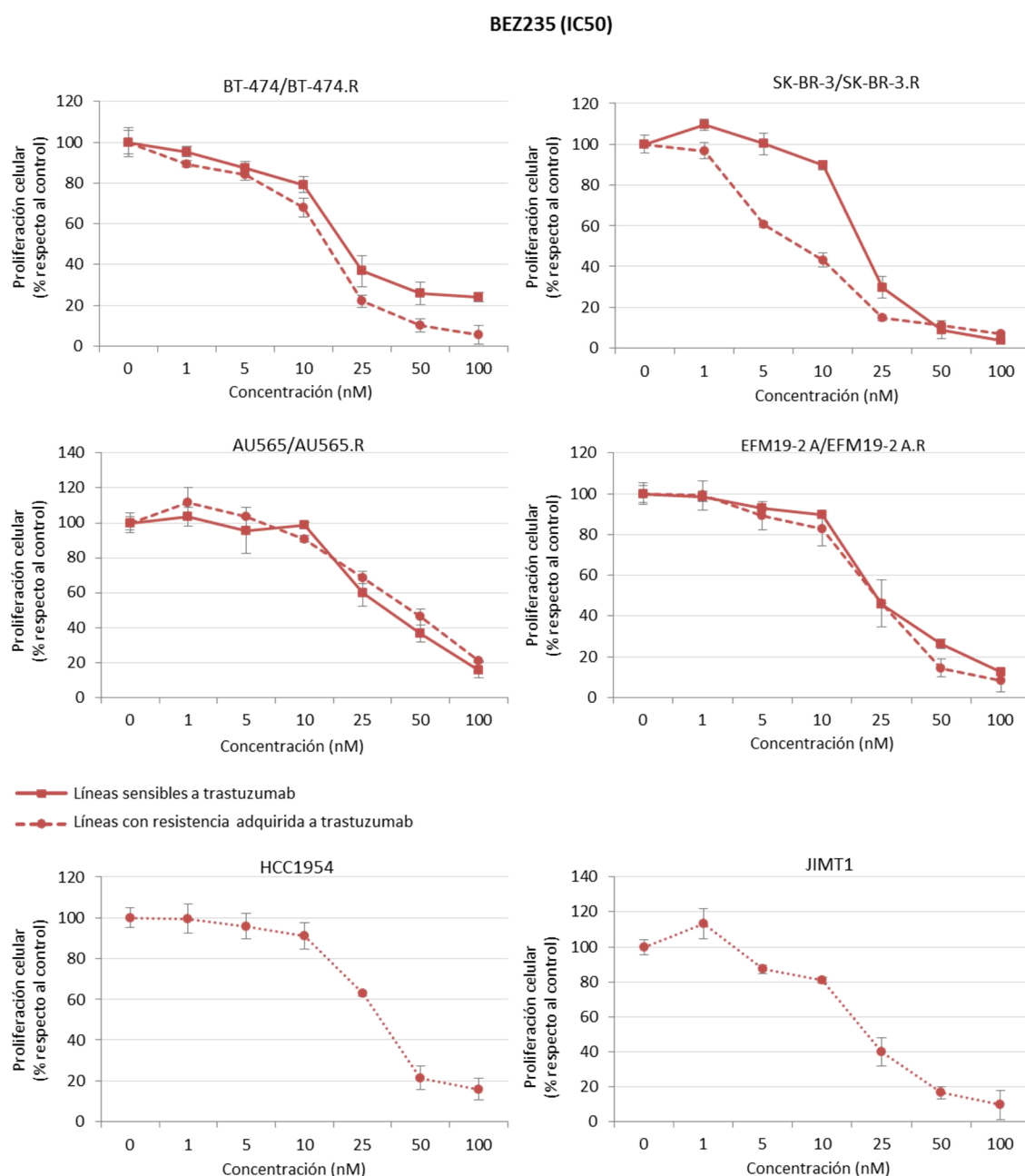


Figura 62. Efecto de la concentración creciente de BEZ235 durante 7 días de tratamiento en las líneas BT-474, BT-474.R, SK-BR-3, SK-BR-3.R, AU565, AU565.R, EFM19-2A, EFM19-2A.R, HCC1954 y JIMT1.

Por último, en el tratamiento con INK128 se observó una alta similitud en la sensibilidad al tratamiento en todas las líneas, tanto sensibles como resistentes a trastuzumab.

INK128 (IC50)

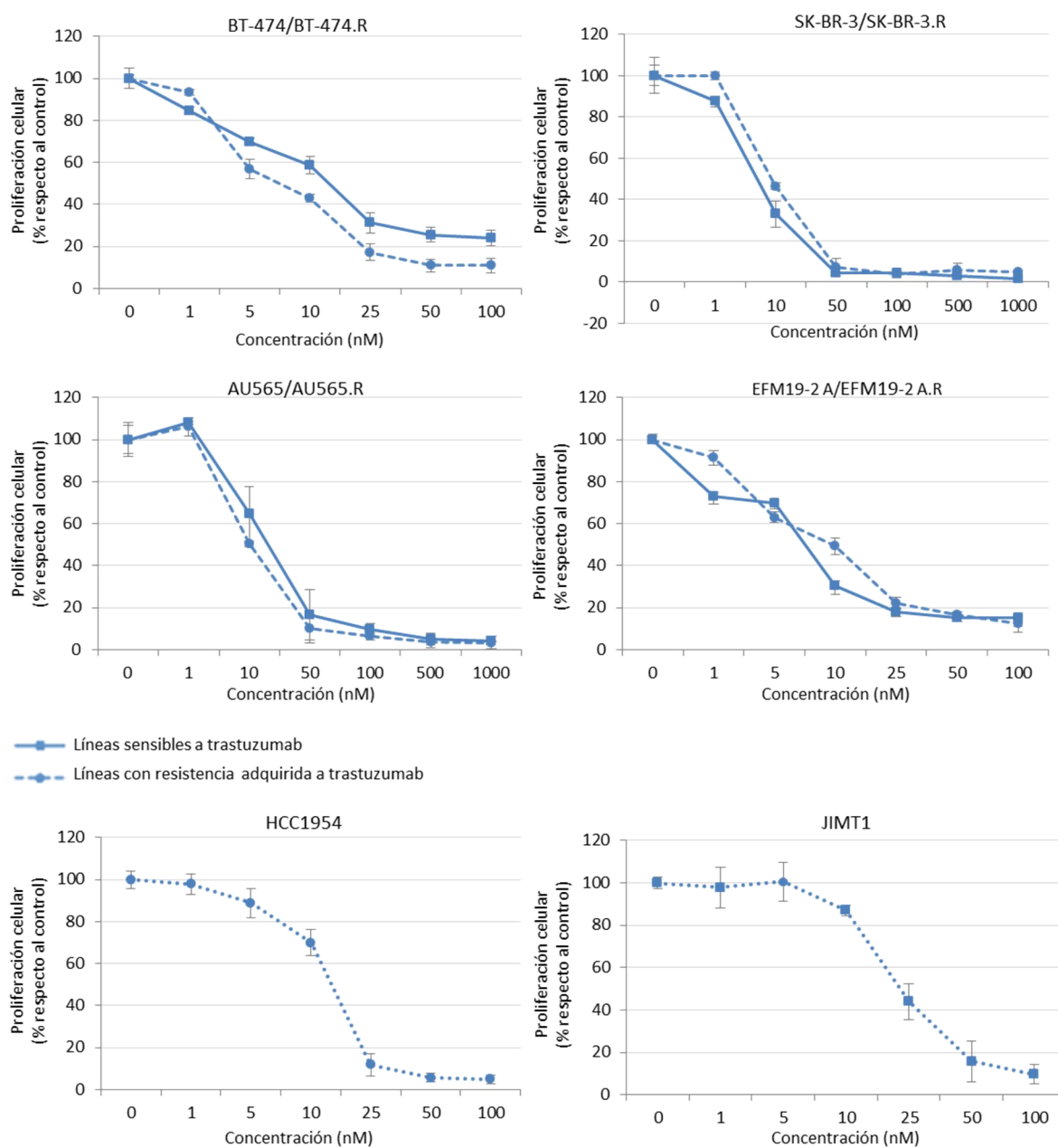


Figura 63. Efecto de la concentración creciente de BEZ235 durante 7 días de tratamiento en las líneas BT-474, BT-474.R, SK-BR-3, SK-BR-3.R, AU565, AU565.R, EFM19-2A, EFM19-2A.R, HCC1954 y JIMT.

En base a estos resultados, se calculó la IC50 para cada una de las líneas y para cada fármaco (Tabla 22). Destacó que el valor de IC50 de everolimus es más heterogéneo entre líneas que los valores de IC50 de los otros dos fármacos. Además, los valores de IC50 de BEZ235 e INK128 entre las líneas resistentes y sus parentales son muy similares, no siendo así el caso de

everolimus en AU565.R y EFM19-2A.R que presentan un valor de IC50 significativamente que su parental.

Tabla 22. Relación de la concentración máxima inhibitoria, IC50, para cada una de la líneas celulares analizadas y para los tras fármacos. Además, se indica el estado sensibilidad a trastuzumab de cada una de las líneas.

Línea celular	IC50 (nM)			Sensibilidad a trastuzumab
	INK128	BEZ235	Everolimus	
BT-474	9,4	3,4	3,7	S
BT-474.R	6,1	2,4	3,8	R
SK-BR-3	5,3	6,3	3,2	S
SK-BR-3.R	8,9	6,4	5,5	R
AU565	13,1	18	7,5	S
AU565.R	9,3	12,8	1,8	R
EFM-192A	5,9	3,6	5,9	S
EFM-192A.R	7,6	2,2	1,8	R
HCC1419	6,7	33,2	0,7364	S/R
HCC1954	12,8	27,3	23,2	R
JIMT-1	21	17,9	0,0955	R

5.2 Valoración del efecto de la terapia combinada de inhibidores de mTOR y trastuzumab

En base a las determinaciones de IC50 para los tras inhibidores empleados se seleccionó una concentración de trabajo por debajo de este valor para evaluar la respuesta de las diferentes líneas al tratamiento combinado con trastuzumab, mediante estudios de proliferación celular a 7 días de tratamiento.

5.2.1 Everolimus

Se seleccionaron dos concentraciones de este fármaco (0,5 nM y 1 nM) por debajo del valor de IC50 en todas las líneas, excepto JIMT1. Se evaluó su efecto en proliferación celular en las cuatro líneas sensibles y con resistencia adquirida a trastuzumab y en las dos líneas resistentes primarias, HCC1954 y JIMT1, en condición sin tratamiento, tratamiento con trastuzumab 15

µg/ml, everolimus 0,5 nM o 1 nM y la combinatoria de ambos tratamientos a las dos concentraciones de everolimus seleccionadas (Figuras 64 y 65).

El tratamiento con everolimus a 0,5 nM no presentó ningún efecto en proliferación celular en ninguna de las líneas sensibles y con resistencia adquirida. Sin embargo el tratamiento de everolimus a 1 nM provocó una disminución significativa del crecimiento en BT-474.R (25,50%), p-valor 0,0035, respecto al control sin tratamiento, considerándose sensibles a everolimus según el algoritmo de O'Brien, con un Δ GR de 4,3 para BT-474.R.

La terapia combinada de trastuzumab con everolimus 0,5 nM provocó una disminución de la proliferación en la línea y everolimus 0,5 nM no mostró ningún efecto en la proliferación celular de las líneas sensibles ni de las resistentes. Sin embargo, en la condición de tratamiento combinado de trastuzumab y everolimus 1 nM se observó una reversión de la resistencia a trastuzumab, disminuyendo muy significativamente la proliferación, en las líneas BT-474.R (20,12%), p-valor 0,003, y EFM19-2A (42,20%), p-valor 0,005, respecto a la condición de tratamiento trastuzumab. Además, esta combinación de tratamiento potenció el efecto de trastuzumab en las 4 líneas sensibles, BT-474 (13,12%), SK-BR-3 (26,20%), AU565 (34,80%) y EFM19-2 A (31,01%), disminuyendo su proliferación respecto a las condiciones de tratamiento único, sin ser estadísticamente significativo (Figura 64).

El tratamiento con everolimus a 0,5 nM demostró un significativo efecto sobre la proliferación celular de la línea HCC1954, en tratamiento combinado con trastuzumab, 58,74%, respecto a 83,67% y 78,35% del tratamiento individual de trastuzumab respectivamente, p-valor < 0,01, revirtiendo la resistencia a trastuzumab. Además, el tratamiento con everolimus 1 nM redujo significativamente la proliferación de esta línea, 11,73% respecto a la condición control, p-valor < 0,001 (Figura 64).

En la línea JIMT1 en tratamiento con everolimus 0,5 nM, tanto en tratamiento único como en combinación con trastuzumab no demostró efectos sobre la proliferación, mientras que el tratamiento con everolimus 1 nM provocó una significativa reducción de la proliferación celular 44,08% respecto a la condición control, p-valor < 0,01 (Figura 64).

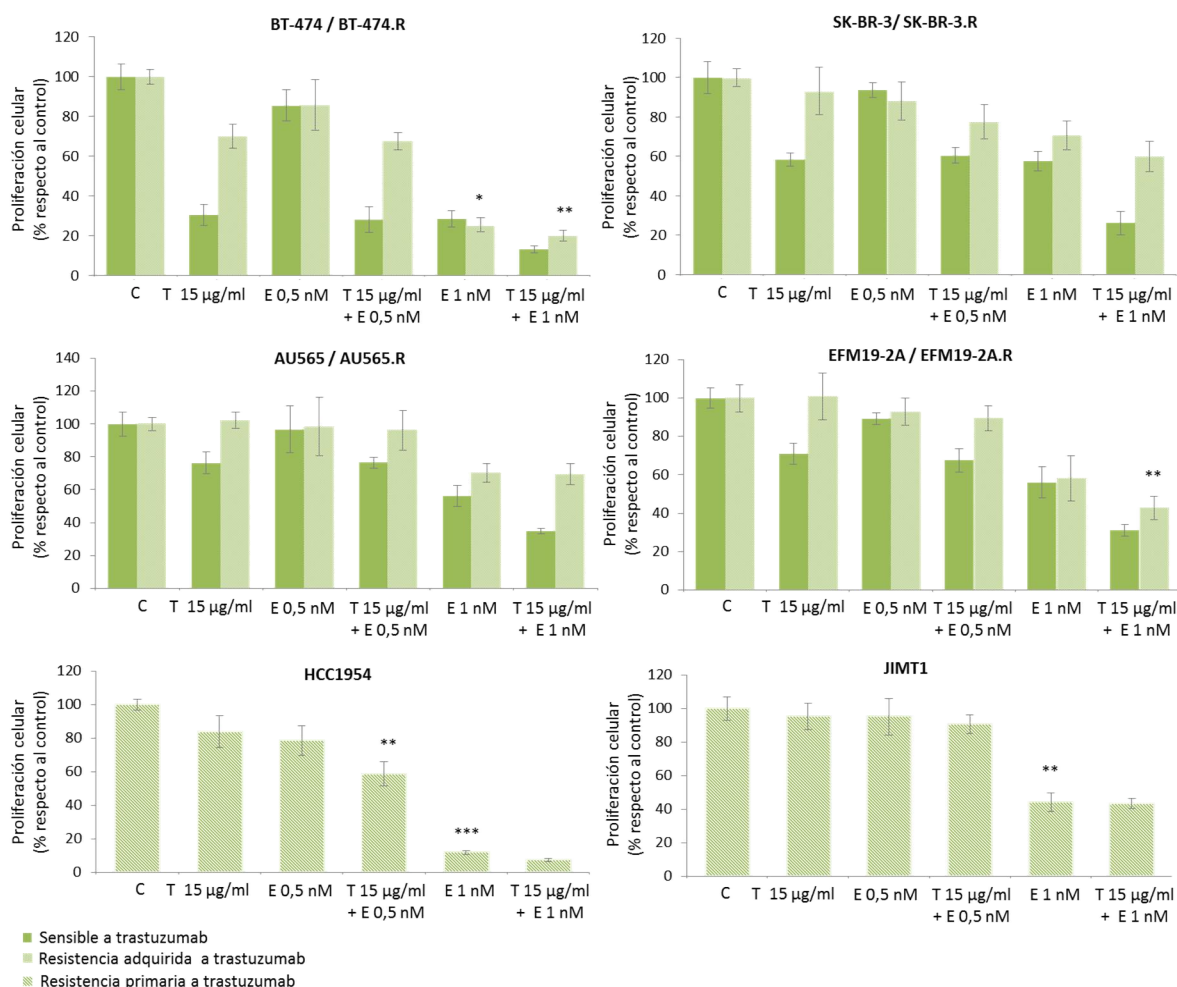


Figura 64. Efecto en la proliferación celular de las líneas celulares BT-474, BT-474.R, SK-BR-3, SK-BR-3.R, AU565, AU565.R, EFM19-2A, EFM19-2A.R, HCC1954 y JIMT1, del tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml (T), everolimus (E) 0,5 nM y 1 nM y la combinación de ambos a 7 días de tratamiento. El tratamiento combinado, everolimus 1 nM más trastuzumab 15 µg/ml provoca una disminución significativa de la proliferación celular en BT-474.R (p-valor < 0,01) y en EFM19-2 A.R (p-valor < 0,01), revirtiendo la resistencia a trastuzumab. En la línea HCC1954 el tratamiento combinado de everolimus 0,5 nM más trastuzumab 15 µg/ml provoca una disminución significativa de la proliferación (p-valor < 0,01), además el tratamiento con everolimus 1 nM también produce una disminución significativa de la proliferación (p-valor < 0,001).

5.2.2 BEZ235

Para testar el efecto en la proliferación celular de BEZ235 en combinación con trastuzumab se seleccionaron tres concentraciones del fármaco (1 nM, 5 nM y 20 nM), todas ellas por debajo del valor de IC50 de todas las líneas. Se evaluó el efecto del tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml, BEZ235 (1 nM, 5 nM y 20 nM) y la combinación de ambos en proliferación celular en las

cuatro líneas sensibles y con resistencia adquirida a trastuzumab y en las dos líneas resistentes primarias, HCC1954 y JIMT1 (Figura 65).

En la línea HCC1954, el tratamiento con BEZ235 a cualquiera de las tres concentraciones testadas en combinación con trastuzumab provocó una disminución significativa de la proliferación. Se observó un 64,94% de proliferación en la condición BEZ235 1 nM más trastuzumab respecto a las condiciones de tratamientos individuales, p -valor $< 0,001$. En la combinatoria de BEZ235 5 nM más trastuzumab se identificó una proliferación del 15,99% respecto al tratamiento de BEZ235 5 nM (28,62%) y el tratamiento con trastuzumab (87,36%), siendo significativa la reducción de la proliferación, p -valor $< 0,01$. Finalmente se observó una proliferación del 7,8% en la combinación de BEZ235 20 nM más trastuzumab, respecto a los tratamientos únicos, p -valor $< 0,01$.

Empleando una concentración de BEZ235 de 20 nM también se observó una disminución significativa de la proliferación en BT-474.R (18,89%) p -valor $< 0,001$ y EFM19-2A.R p -valor $< 0,001$ (29,83%) respecto a las condiciones control y de tratamiento con trastuzumab. Además, en BT-474.R el tratamiento combinado de BEZ235 más trastuzumab significativamente revirtió la resistencia a trastuzumab, 45,18% respecto a las condiciones de tratamiento con trastuzumab y tratamiento con BEZ235, p -valor $< 0,001$.

En las líneas celulares sensibles el tratamiento combinado de trastuzumab más BEZ235 20 nM potenció el efecto del trastuzumab de manera individual, sin llegar a observarse un efecto significativo. La proliferación celular de JIMT1 no se vio afectada por ninguna de las condiciones de tratamiento.

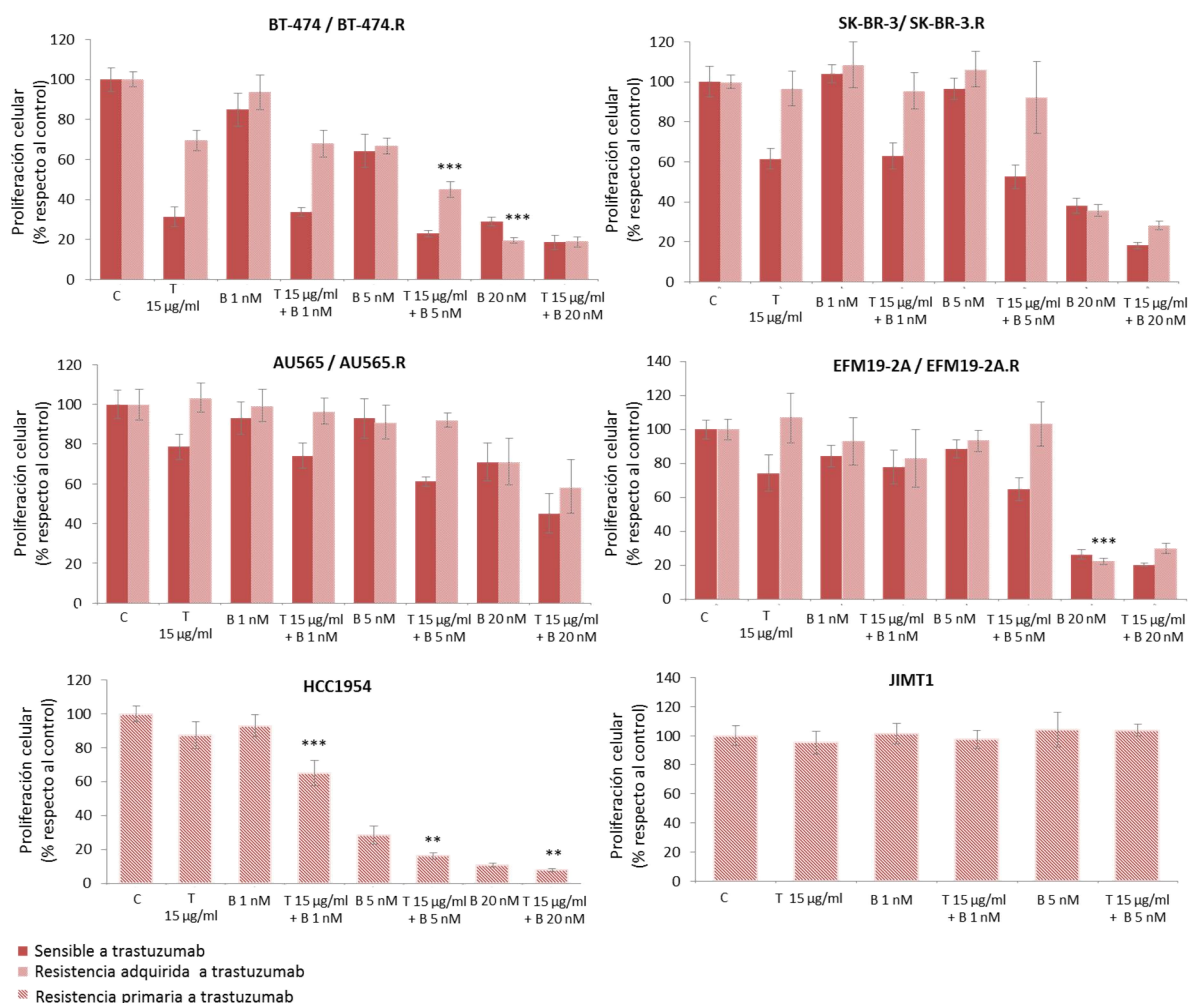


Figura 65. Efecto en la proliferación celular de las líneas celulares BT-474, BT-474.R, SK-BR-3, SK-BR-3.R, AU565, AU565.R, EFM19-2A, EFM19-2A.R, HCC1954 y JIMT1, del tratamiento con trastuzumab (T) 15 µg/ml, BEZ235 (B) 1 nM, 5 nM y 20 nM y la combinación de ambos tratamientos a 7 días. El tratamiento combinado, BEZ235, en las tres concentraciones empleadas, mas trastuzumab 15 µg/ml disminuye significativamente la proliferación celular en HCC1954 respecto a la condición trastuzumab 15 µg/ml y BEZ235 1 nM (p-valor < 0,001), 5 nM (p-valor < 0,01) y 20 nM (p-valor < 0,01). Revirtiendo la resistencia a trastuzumab en este línea. El tratamiento combinado, BEZ235 5 nM más trastuzumab 15 µg/ml disminuye la proliferación celular en BT-474.R (p-valor < 0,001) respecto a trastuzumab 15 µg/ml. Además, el tratamiento con BEZ235 20 nM disminuye la proliferación significativamente en BT-474.R (p-valor < 0,001) y EFM19-2 A.R (p-valor 0,001).

5.2.3 INK128

El efecto del tratamiento del inhibidor INK128 se evaluó empleando dos concentraciones de tratamiento, 1 nM y 5 nM, en monoterapia y en combinación con trastuzumab en las cuatro líneas sensibles y con resistencia adquirida a trastuzumab y en las dos líneas resistentes primarias, HCC1954 y JIMT1 (Figura 66).

El tratamiento único con INK128 no mostró efecto en la proliferación celular en ninguna de las líneas celulares en ninguna de las dos concentraciones utilizadas. El tratamiento combinado de trastuzumab e INK128 5 nM provocó reversión de la resistencia adquirida en todas las líneas. Las células BT-474.R presentaron una disminución muy significativa de la proliferación en la condición de trastuzumab e INK128 (52,11%) respecto a las condiciones de trastuzumab 84,05% y INK128 66,50%, p-valor < 0,01. Además, también se observó una bajada significativa de la proliferación en la terapia combinada trastuzumab con INK128 1 nM, 76,89% versus 84,05% de trastuzumab y 102,49% INK128 1 nM, p-valor < 0,05. En la línea SK-BR-3.R, la combinación de trastuzumab e INK128 5 nM disminuyó muy significativamente el crecimiento (43,94%) respecto al tratamiento con trastuzumab (96,12%) e INK128 (77,34%), p-valor < 0,001. El mismo efecto se observó en la línea AU565.R con reducción de su proliferación en la terapia combinada hasta el 63,53% respecto a 100,15% en la condición de trastuzumab y 83,83% de INK128, siendo estadísticamente significativo p-valor < 0,001. Por último, en EFM19-2A.R, se identificó una disminución significativa de la proliferación ante la terapia combinada, trastuzumab mas INK128 5 nM, 64,90% frente a los tratamientos de trastuzumab e INK128, 101,14% y 80,98% respectivamente, p-valor 0,01.

Este efecto de reversión de la resistencia también se observó la línea con resistencia primaria HCC1954. La terapia combinada de trastuzumab e INK128 5 nM redujo significativamente la proliferación, 57,38% frente al tratamiento con trastuzumab, 84,57%, y con INK128, 81,09%, p-valor < 0,001.

La proliferación celular de la línea JIMT1 no se vio modificada por ninguna de las condiciones de tratamiento testadas.

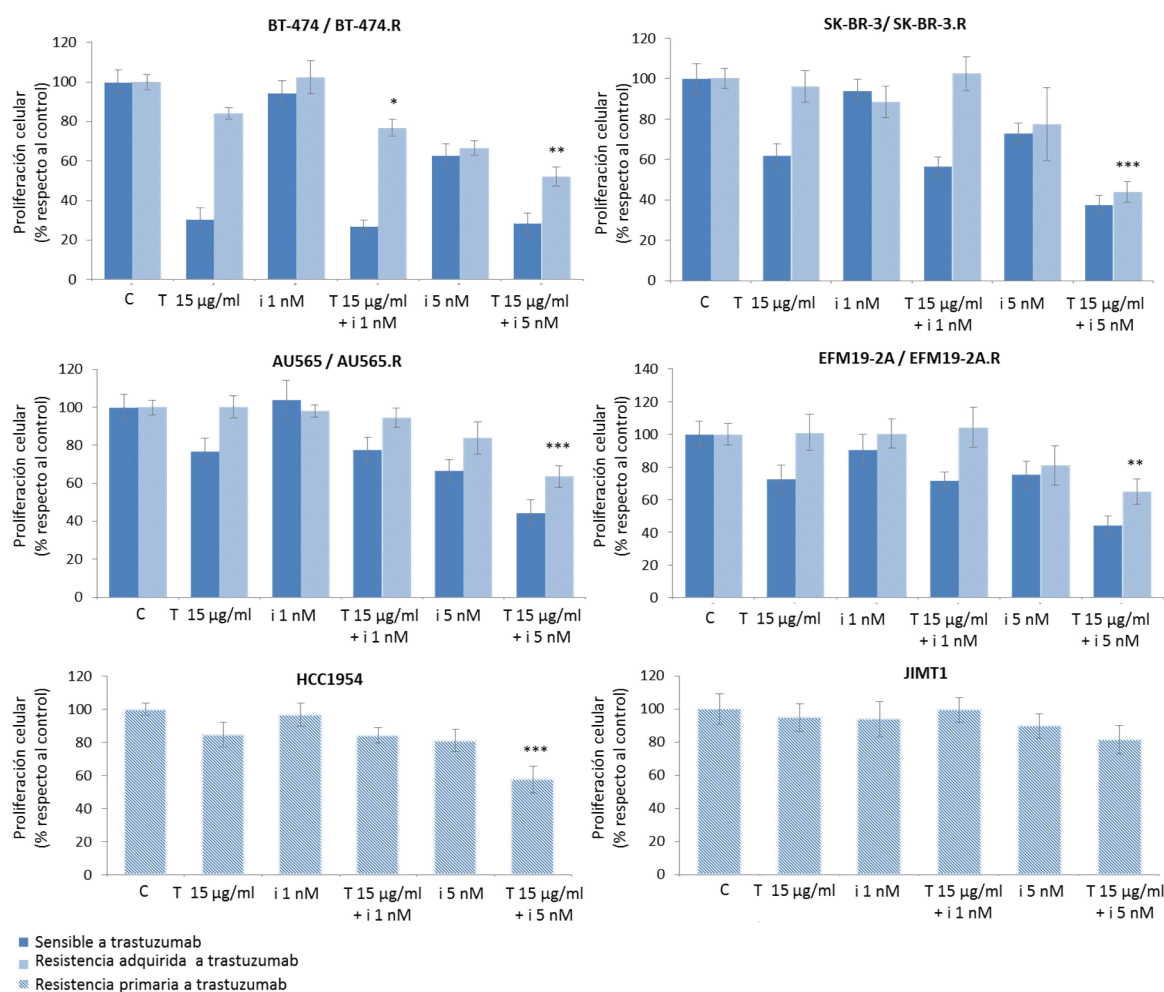


Figura 66. Efecto en la proliferación celular de las líneas celulares BT-474, BT-474.R, SK-BR-3, SK-BR-3.R, AU565, AU565.R, EFM19-2A, EFM19-2A.R, HCC1954 y JIMT1, del tratamiento con trastuzumab (T) 15 µg/ml, INK128 (i) a 1 nM y 5 nM y la combinación de ambos tratamientos a 7 días. El tratamiento de trastuzumab 15 µg/ml más INK128 1 nM (p-valor < 0,05) y de trastuzumab 15 µg/ml más INK128 5 nM (p-valor < 0,001) disminuye significativamente la proliferación celular en BT-474.R; en SK-BR-3.R (p-valor < 0,001), AU565 (p-valor < 0,001), EFM19-2A.R (p-valor 0,01) y HCC1954 (p-valor < 0,001) el tratamiento combinado trastuzumab mas INK128 5 nM disminuye significativamente la proliferación celular la revirtiendo la resistencia a trastuzumab.

5.3 Efecto molecular del tratamiento combinado de INK128 y trastuzumab

Dado que el tratamiento con el inhibidor INK128 demostró que, en combinación con trastuzumab, es capaz de revertir la resistencia a trastuzumab en las 4 líneas celulares generadas con resistencia adquirida, se evaluó el efecto de la combinación de ambos tratamientos en la inhibición de la ruta PI3K/AKT/mTOR. El efecto molecular del tratamiento se valoró analizando la fosforilación de las proteínas efectoras de los dos complejos de mTOR; p-S6 (Ser 235/236), p-4EBP1 (Thr 37/38) y p-4EBP1 (Thr 70) del complejo mTORC1 y p-AKT (Ser 473) del complejo mTORC2, así como sus formas totales. Además se incluyó el análisis de la forma

fosforilada de ERK. El perfil de expresión de proteínas se llevó a cabo a partir de extractos de proteínas de las líneas celulares obtenidos tras 24 horas de tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml, tratamiento con INK128 5 nM, INK128 50 nM, combinatoria de trastuzumab 15 µg/ml más INK 5 nM, combinatoria de trastuzumab 15 µg/ml más INK 50 nM y condición control.

También se realizó el estudio del efecto molecular de INK128 sobre las dos líneas con resistencia primaria a trastuzumab, HCC1954 y JIMT1, en las mismas condiciones de tratamiento.

El tratamiento combinado de trastuzumab con INK128 a cualquiera de las dos concentraciones testadas, provoca una disminución en la línea BT-474 de los niveles de fosforilación de p-AKT (Ser 473), sin observarse modificación de los niveles de total de AKT, aunque no en la línea BT-474.R. En ambas líneas se observa que el tratamiento combinado de INK128 5 nM más trastuzumab, provocó una reducción significativa de p-S6 (Ser 235/236) respecto a la condición de tratamiento único, aunque esta reducción no se observa en la dos formas fosforiladas de 4EBP1. En la condición de tratamiento con INK128 de 50 nM, su combinación con trastuzumab indujo una desaparición de los niveles de la forma p-S6 (Ser 235/236) y una reducción significativa de los niveles de p-4EBP1 (Thr 37/38) y (Thr 70), tanto en las células sensibles como las resistentes. Además, únicamente en la línea sensible se observa que la combinatoria de tratamiento de INK128 con trastuzumab provocó una disminución de la forma fosforilada p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), respecto a los niveles detectados en las condiciones de tratamientos únicos (Figura 67).

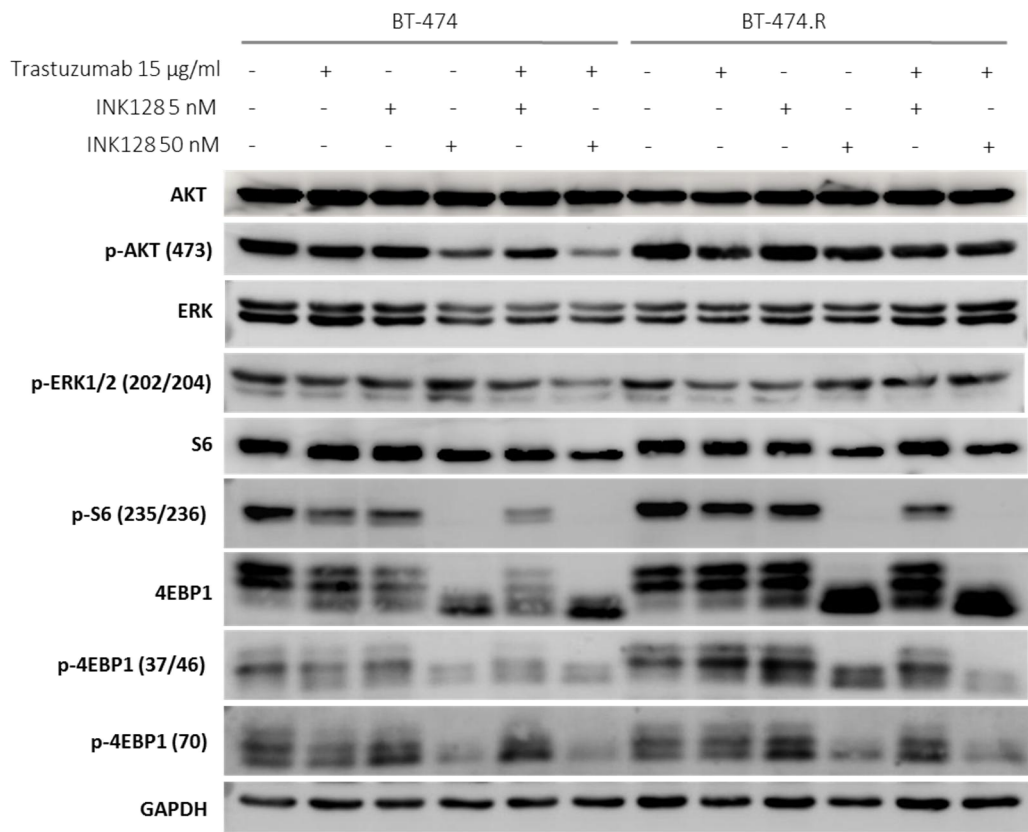


Figura 67. Análisis de inmunodetección de las líneas BT-474 y BT-474.R en condiciones basales, tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml, tratamiento con INK128 a 5 nM y 50 nM y tratamiento combinado de trastuzumab mas INK128 a ambas concentraciones. Bajo un adecuado control de carga con GAPDH, se observaron diferencias en los niveles de fosforilación entre los tratamientos únicos u el tratamiento combinado de trastuzumab más INK128 en ambos líneas celulares.

En las líneas SK-BR-3 y SK-BR-3.R se observó que el tratamiento de INK128 50 nM y el tratamiento combinado con trastuzumab redujeron los niveles de p-AKT (Ser 473), respecto a la condición basal y tratamiento con trastuzumab, sin que se modificase la expresión de la forma total. En ambas líneas, también se aprecia que el tratamiento con INK128 más trastuzumab disminuye las fosforilación de p-S6 (Ser 235/236) respecto a los niveles detectados en las condiciones de los tratamientos de forma separada. Además, en la condición de tratamiento con 50 nM de INK128 y la condición de combinación con trastuzumab provocó un disminución muy significativa de la activación de p-S6 (Ser 235/236), al igual que ocurre con las formas fosforiladas de 4EBP1, p-4EBP1 (Thr 37/38) y p-4EBP1 (Thr 70). Destacó, también que las formas totales de S6 y 4EBP1 se vieron afectadas por el tratamiento con INK128 50 nM y la combinación con trastuzumab (Figura 68).

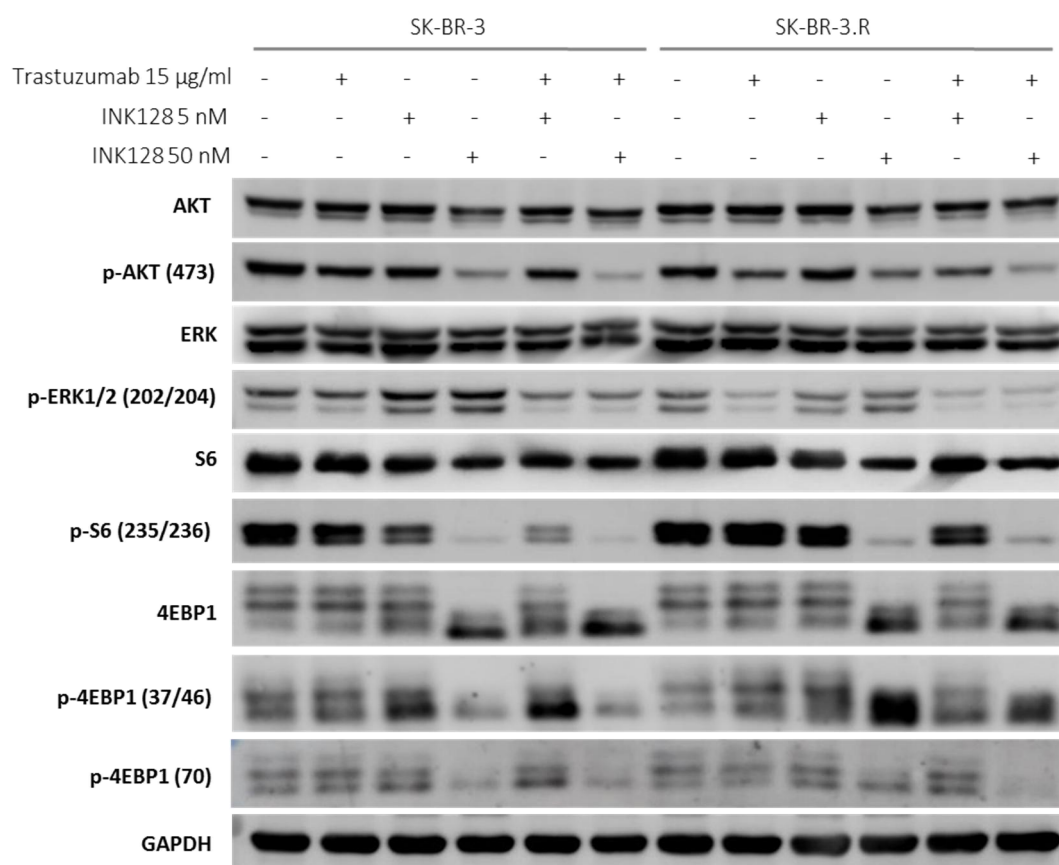


Figura 68. Análisis de inmunodetección realizado en las líneas SK-BR-3 y SK-BR-3.R en condiciones basales, tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml, tratamiento con INK128 a 5 nM y 50 nM y tratamiento combinado de trastuzumab mas INK128 a ambas concentraciones. Bajo un adecuado control de carga con GAPDH, se observaron diferencias en los niveles de fosforilación entre los tratamientos únicos u el tratamiento combinado de trastuzumab más INK128 en ambos líneas celulares.

El tratamiento con INK128 en combinación con trastuzumab en las líneas AU656 y AU565.R, provocó una disminución de la fosforilación de p-AKT (Ser 473) y de los niveles de p-S6 (Ser 235/236) respecto a trastuzumab. Además, el tratamiento único de INK128 incidió en p-S6 (Ser 235/236), disminuyéndola respecto a la condición basal. Al igual que ocurre en las líneas SK-BR-3 sensible y resistente, la forma total de 4EBP1 disminuyó en presencia del tratamiento con INK128 a cualquiera de las dos concentraciones testadas y en combinación con trastuzumab, al igual que la forma fosforilada p-4EBP1 (Thr 37/38). En estas líneas los niveles de fosforilación de p-4EBP1 (Thr 70) son casi indetectables y no se pueden valorar diferencias entre las distintas condiciones de tratamiento (Figura 69).

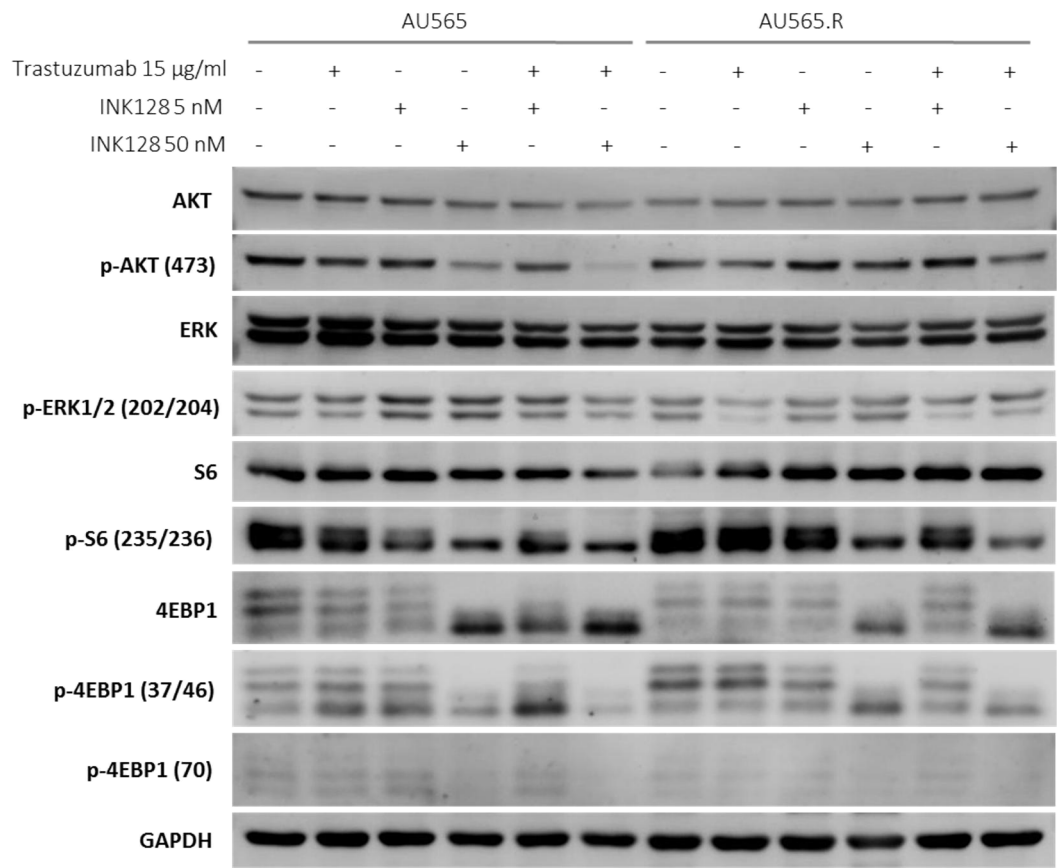


Figura 69. Análisis de inmunodetección en las líneas AU565 y AU565.R en condiciones basales, condición de tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml, tratamiento con INK128 5 nM y 50 nM y condición de tratamiento combinado de trastuzumab mas INK128 a 5 nM y 50 nM. Bajo un adecuado control de carga con GAPDH, se identificaron diferencias en los niveles de fosforilación entre los tratamientos únicos y la combinatoria de tratamiento de trastuzumab más INK128 en ambos líneas.

La inmunodetección realizada en las líneas EFM19-2A y EFM19-2A.R determinó que el tratamiento con INK128 a 5 nM y 50 nM y la combinación con trastuzumab provocó, al igual que en la líneas analizadas previamente, un inhibición de la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR. En ambos líneas se observa que los niveles de las forma fosforilada p-AKT (Ser 473) disminuyó en presencia trastuzumab con INK128, a ambas concentraciones, respecto al efecto que provoca los tratamientos únicos. En la línea EFM19-2A además se observó disminución de los niveles de p-AKT (Ser 473) en presencia de INK128 50 nM respecto a la condición de trastuzumab. En ambas líneas el tratamiento con INK128 50 en combinación con trastuzumab, provocó una desaparición de p-S6, además de disminuir los niveles de la proteína total. Por último, destaca que la línea EFM19-2A.R presentó una importante activación de p-4EBP1 (Thr 70) respecto a su línea parental, siendo los niveles de 4EBP1 total muy similares. El tratamiento combinado de trastuzumab más INK128 provocó una inhibición de la activación de p-4EBP1 (Thr 70), disminuyendo su fosforilación respecto a la condición de trastuzumab y de INK128 en

monoterapia. Además, al igual que se observa en las otras líneas celulares, los niveles de la forma total 4EBP1 disminuyeron en presencia de INK128 respecto a la condición basal. En la línea EFM19-2A, al igual que ocurre en BT474, el tratamiento combinado de trastuzumab con INK128 a ambas concentraciones, provocó una disminución de los niveles de fosforilación de p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) respecto a los niveles observados en las condiciones de tratamientos únicos (Figura 70).

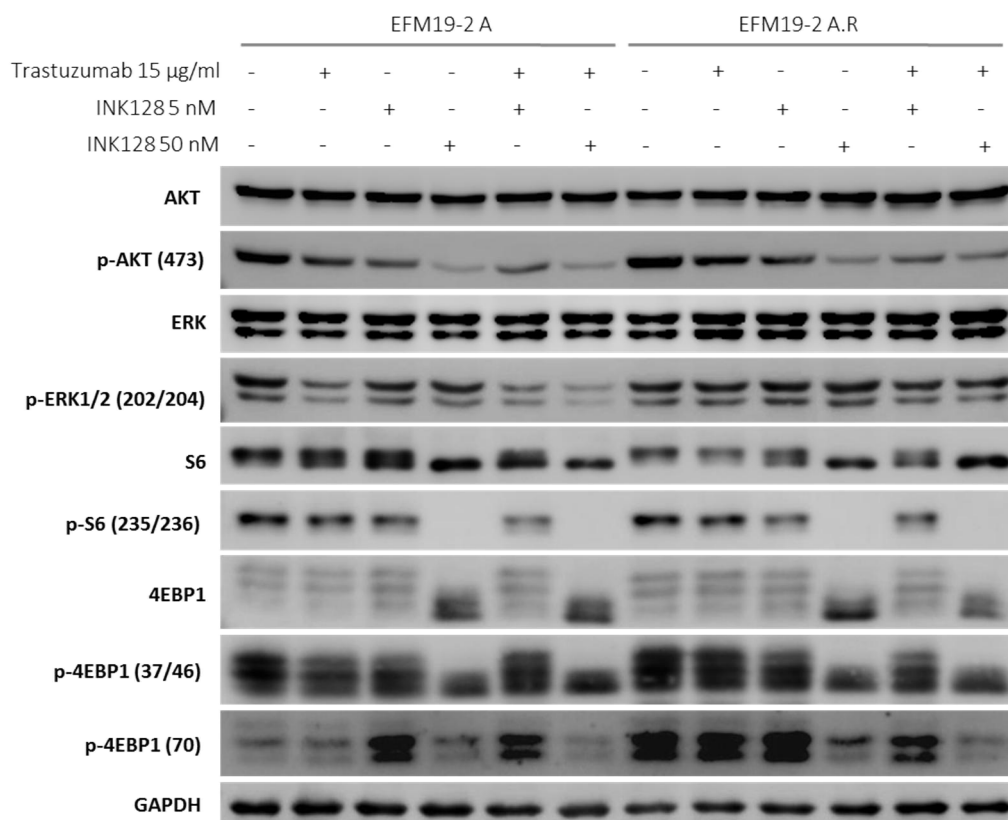


Figura 70. Análisis de inmunodetección realizado en las líneas EFM19-2 A y EFM19-2 A.R en condiciones basales, condición de tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml, tratamiento con INK128 5 nM y 50 nM y condición de tratamiento combinado de trastuzumab mas INK128 a 5 nM y 50 nM. Bajo un adecuado control de carga de GAPDH, se identificaron diferencias en los niveles de fosforilación entre los tratamientos únicos y la combinatoria de tratamiento de trastuzumab más INK128 en ambos líneas.

La línea HCC1954 mostró una ligera disminución de la fosforilación de p-AKT (Ser 473) en presencia del tratamiento combinado a ambas concentraciones respecto a la condición de tratamiento con trastuzumab. También, se observó que p-S6 (Ser 235/236) disminuyó de forma importante debido al tratamiento con INK128 en cualquiera de las dos concentraciones y en presencia o no de trastuzumab. Del mismo modo, el tratamiento con INK128, de forma independiente de la adición de trastuzumab, provocó una disminución de la forma total de 4EBP1, al igual que de su forma fosforilada p-4EBP1 (Thr 37/38). En esta línea los niveles de

fosforilación de p-4EBP1 (Thr 70) son casi indetectables por lo que no se pueden valorar diferencias entre los distintos tratamientos (Figura 71 A).

En la línea JIMT1, únicamente se observó que el tratamiento con INK128 a cualquiera de las dos concentraciones provocó una disminución de p-S6 (Ser 235/236) independientemente de la presencia o no de trastuzumab, respecto a la condición control. No se observaron modificaciones en 4EBP1 ni en sus formas fosforiladas ni en AKT y su forma fosforilada (Figura 71 B).

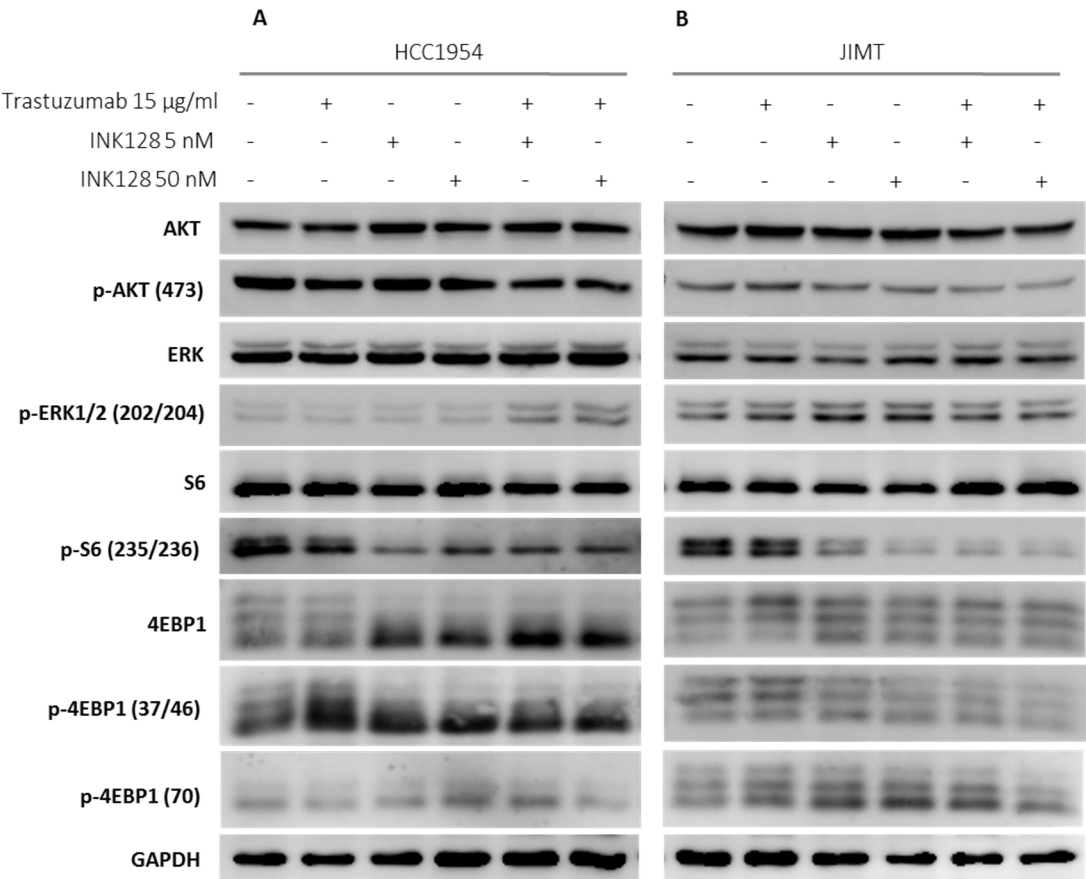


Figura 71. Análisis de inmunodetección realizado en la líneas resistentes primarias, HCC1954 y JIMT en condiciones basales, condición de tratamiento con trastuzumab 15 µg/ml, tratamiento con INK128 5 nM y 50 nM y condición de tratamiento combinado de trastuzumab mas INK128 a 5 nM y 50 nM. **A)** Bajo un adecuado control de carga de GAPDH, se identificaron diferencias en los niveles de fosforilación entre los tratamientos únicos y la combinatoria de tratamiento de trastuzumab más INK128 en ambos líneas. **B)** Únicamente se observan diferencias de fosforilación en p-S6 (Ser 235/236) en presencia del tratamiento con INK128 a ambas concentraciones.

Discusión

Los tumores de mama de HER2 positivos constituyen entre el 15-20% de los tumores de mama diagnosticados. Inicialmente, lo que constituía una entidad agresiva y con una alta mortalidad ha pasado a ser una entidad con un pronóstico favorable y una importante supervivencia libre de enfermedad a 5 años gracias a la incorporación en la práctica clínica de las terapias anti-HER2, inicialmente con trastuzumab y, posteriormente, con la incorporación de nuevos fármacos. Sin embargo, aún existe un 25% de las pacientes HER2 positivas tratadas con trastuzumab que no responden al tratamiento debido a la presencia de mecanismos de resistencia presentes en el tumor primario o a la adquisición de nuevas alteraciones moleculares que limitan la acción al tratamiento [121,122].

1. Sensibilidad a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo

Para evaluar los mecanismos moleculares de resistencia a trastuzumab en nuestro trabajo se ha evaluado, sobre un panel de 8 líneas de cáncer de mama HER2 positivas, la sensibilidad a trastuzumab. Este fármaco es un anticuerpo monoclonal agonista del receptor HER2 cuyo papel fundamental es bloquear la actividad del receptor, teniendo un efecto fundamentalmente anti-proliferativo [169].

La selección de la concentración de trastuzumab empleada se ha basado en las referencias de la literatura, en la que se encuentran concentraciones muy variables [95,171,185,186], con valores entre 1 µg/ml [122] hasta 100 µg/ml de trastuzumab [170]. Finalmente, en nuestro trabajo se ha seleccionado la concentración equivalente a la detectada en plasma de las pacientes tratadas con el fármaco en los ensayos preclínicos, alrededor de 10-20 µg/ml [169,170,172], que coincide con la concentración seleccionada en el primer modelo de resistencia a trastuzumab descrito [171].

Dado el efecto anti-proliferativo que presenta este fármaco, la evaluación de la sensibilidad a trastuzumab en líneas celulares se debe de realizar mediante experimentos de exposición al tratamiento durante 7 días, donde se determina la inhibición de la proliferación celular respecto a la condición control sin tratamiento [153]. En este trabajo, hemos aplicado el algoritmo descrito por O'Brien, en el que se determina el cambio de la proliferación celular basado en el tiempo de doblaje de las células tratadas frente a las células sin tratamiento, además de valorar el porcentaje de crecimiento frente al control, para evaluar el grado de resistencia a trastuzumab [153,172]. Aplicando este algoritmo se ha concluido que las líneas de cáncer de mama BT-474, SK-BR-3, AU565 y EFM19-2A presentan sensibilidad a trastuzumab ($\Delta GR \geq 1.2$ y % disminución $\geq 20\%$), de acuerdo como se ha descrito en la literatura, y que las líneas

HCC1569, HCC1954 y JIMT1, presentan resistencia primaria [153,172,187]. Sin embargo, en este trabajo, aplicando el algoritmo de O'Brien, consideramos que la línea HCC1419 presenta una resistencia intermedia a trastuzumab, coincidente con la publicación de Gayle en la que se clasifica como sensible [188], mientras que otros autores la catalogan como resistente primaria a trastuzumab [153,189].

El proceso de generación de la resistencia adquirida a trastuzumab a partir de las líneas celulares de cáncer de mama sensibles a trastuzumab se ha realizado siguiendo un esquema previamente descrito en la literatura, basado en el modelo del grupo de Kute, que en 2004 publicaron la primera descripción de generación de líneas celulares con resistencia adquirida a trastuzumab [171]. Este modelo se caracteriza por una exposición continuada al fármaco a una concentración de 10 µg/ml de la línea BT-474 durante dos semanas. Tras esta exposición, las células fueron cultivadas en presencia de trastuzumab. Sin embargo, el tiempo de generación de la resistencia en nuestro trabajo ha sido superior a lo descrito por Kute, más acorde con otros trabajos publicados, que describen periodos de 2 a 6 meses [172,185,186]. Siguiendo lo descrito por el grupo de Chan [172], tras la validación de la resistencia adquirida por exposición continuada a trastuzumab, comprobamos la estabilidad de la resistencia generada en nuestro trabajo, tras la retirada del trastuzumab del medio durante 1 mes. La resistencia generada a trastuzumab también, fue validada en modelos *in vivo*, únicamente en las células BT-474, debido a que es la única línea celular empleada en nuestro trabajo con capacidad tumorogénica, determinado que la resistencia a trastuzumab generada es estable en modelos *in vivo*, obteniendo los mismos resultados que el grupo de Scaltriti [95].

2. Resistencia primaria a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo

La resistencia primaria a trastuzumab es consecuencia de la presencia de alteraciones en el tumor primario, que impiden la acción de trastuzumab o bien contrarrestan su efecto. Este hecho ocasiona una menor respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo.

En el presente trabajo se han analizado, a partir de los datos obtenidos del repositorio *Cancer Cell Encyclopedia*, las diferentes alteraciones en número de copias y mutaciones existentes entre las líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas con resistencia primaria y las líneas con sensibilidad a trastuzumab, definidas por el algoritmo de O'Brien y colaboradores [153], y confirmadas a partir de nuestros propios experimentos. Los resultados obtenidos de este

análisis identificaron 6 genes amplificados (UBR5 (8q22.3), STK3 (8q22.2), RGS22 (8q22.2), PDP1 (8q22.1), SNAI2 (8q11.21) y C8orf4 (8p11.21)) en las líneas resistentes a trastuzumab frente a las líneas sensibles, todos ellos localizados una región común del cromosoma 8 (8p11.21-q22.3), lo que indica que existe una ganancia de esta región cromosómica de forma común en estas líneas resistentes, que podría estar implicada en la resistencia primaria a trastuzumab.

Diferentes autores han descrito esta ganancia del brazo largo del cromosoma 8 en cáncer de mama HER2 positivo mediante análisis de arrays comparativos de hibridación genómica (aCGH) y alteraciones del número de copias (CNAs), asociándose de forma general a un peor pronóstico de la enfermedad y estando presente en tumores de mama de alto grado [190–196]. Se define que la ganancia de esta región del cromosoma 8 se traduce en la amplificación de multitud de genes relacionados con procesos de proliferación celular e invasión [193,195]. Además, Rennstam y colaboradores definieron a partir de la caracterización citogenética de la línea celular JIMT1, que la ganancia del cromosoma 8, junto con la ganancia de otras regiones cromosómicas, se asocia a resistencia primaria a trastuzumab [197]. El estudio publicado por Bergamaschi en 2006, determinó que la ganancia de la región 8q, se detecta en un 35% de los tumores de mama analizados, concretamente la ganancia de la región cromosómica 8q11-24 [198], esta región comprende parte de los genes amplificados en las líneas con resistencia primaria a trastuzumab determinadas en nuestro trabajo. Estudios posteriores, han corroborado la ganancia del brazo largo del cromosoma 8, describiendo ganancias concretas de las regiones 8q22.1-q22.3, y 8q24.21-q24.3 [199,200]. Sin embargo, actualmente no existe ningún trabajo en el que asocie esta ganancia del cromosoma 8 con la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama. Únicamente se ha descrito que la ganancia del brazo largo del cromosoma 8 está implicado en la resistencia a taxanos en cáncer de mama (Han et al. 2010). Esta misma ganancia se ha descrito en otros tipos tumorales, como cáncer de colon [201,202], carcinoma renal de células claras [203], y cáncer de próstata [204,205] asociándose en todos los casos a una menor supervivencia libre de enfermedad y una mayor tasa de recaída.

En nuestro trabajo se confirmó la existencia de ganancia de esta región cromosómica mediante la determinación por FISH del gen PDP1 (8q22.1), además se incluyó el análisis del número de copias del gen MYC dada su localización (8q24.21), cercana a la región amplificada detectada y a su implicación descrita en cáncer de mama HER2 positivo. El análisis del FISH de PDP1 determinó una dotación normal para PDP1 en las líneas sensibles a trastuzumab y un incremento del número copias del gen en las líneas resistentes primarias; sin embargo, el gen MYC presenta ganancia moderada en las líneas sensibles trastuzumab, y una significativa

amplificación del número de copias del gen en las líneas resistentes primarias respecto de las células sensibles. La ganancia de MYC se ha definido en líneas celulares de cáncer de mama [174], asociado a la implicación de este gen en el proceso de inmortalización celular de las células en cultivo [175]. Además, el análisis de la amplificación de PDP1 y MYC en la cohorte de pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo en tratamiento con neoadyuvancia demostró que la ganancia de estos genes se asocia a una peor respuesta patológica completa a trastuzumab, postulando a estos dos genes como posibles marcadores predictivos de respuesta al tratamiento con trastuzumab.

En cáncer de mama HER2 positivos existe entre un 40% de tumores que presentan co-amplificación del oncogén MYC [206–208], estos datos correlacionan con el porcentaje de pacientes con ganancia del gen MYC obtenido en nuestra serie de pacientes, un 48%. Pero, aunque el papel de MYC en cáncer de mama ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, no existe un consenso sobre su implicación en esta enfermedad. En modelos celulares de cáncer de mama HER2 positivo la sobreexpresión y/o amplificación de MYC se ha asociado con resistencia primaria a trastuzumab a través de la activación pRB [209]. Sin embargo, en el ensayo clínico fase III NSABPB-31 en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo localmente avanzado, en el que se comparaba el brazo de tratamiento doxorubicina-ciclofosfamida seguido de taxanos frente a doxorubicina-ciclofosfamida seguido de taxanos-trastuzumab, la co-amplificación de HER2 y del oncogén MYC se asocia una mejor supervivencia libre recurrencia y a un mayor beneficio a la adición de trastuzumab al tratamiento de quimioterapia convencional [210]. Además, en esquema de neoadyuvancia la amplificación de MYC y la negatividad de receptores de progesterona se asocian a una mayor respuesta patológica completa al tratamiento de quimioterapia más trastuzumab [26]. Estos resultados han sido rebatidos por diferentes autores que postulan que la ganancia del gen MYC no está significativamente asociada al beneficio de la terapia con trastuzumab en esquema de adyuvancia, y que el beneficio del esquema de tratamiento doxorubicina-ciclofosfamida seguido de taxanos-trastuzumab observado en el ensayo NSABPB-31 se debe únicamente a la presencia de amplificación de HER2 (Perez et al. 2011; Dueck et al. 2013; Pereira et al. 2016). Kurosumi y colaboradores describen que la sobreexpresión de MYC se correlaciona, en cáncer de mama HER2 positivo, con una mejor respuesta a la quimioterapia convencional [213] y el grupo de Pereira, recientemente, ha descrito que esta amplificación es un factor predictivo de respuesta patológica completa al tratamiento basado en quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas-ciclofosfamida más taxanos [212]. Además, también se ha definido que la ganancia de MYC, junto otras alteraciones moleculares, en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo

avanzado, predicen una peor respuesta al tratamiento con trastuzumab [176].

El otro gen analizado en nuestro trabajo, PDP1, con amplificación demostrada en las líneas resistentes primarias a trastuzumab, que codifica para la fosfatasa PDPC1 siendo su función principal la de regular al complejo de piruvato deshidrogenasas (PDC), modulando el metabolismo celular [214,215]. Su implicación en cáncer es muy poco conocida, y no se han descrito ganancias o amplificación del gen en el contexto de cáncer de mama. No obstante, en cáncer de colon, mediante aCGH, se ha identificado que existen importantes amplificaciones de regiones cromosómicas, donde destaca la ganancia de 8q22.1, correspondiente a la localización de PDP1 y 8q24.3 [202].

Nuestros hallazgos con PDP1 y MYC en los modelos celulares con resistencia primaria, confirmados en la cohorte de pacientes de cáncer de mama precoz HER2 positivo tratadas con trastuzumab en neoadyuvancia, sugieren que la ganancia de ambos genes de forma conjunta implica una peor respuesta a esta terapia anti-HER2. Sin embargo, existen otros genes en la misma región cromosómica, también amplificados en los modelos de resistencia a trastuzumab, que no han sido objeto de estudio en este trabajo, y que podrían estar también implicados en dicha resistencia primaria a este fármaco. En todo caso, el estudio del número de copias de PDP1 y MYC podrían ser empleados como un marcador subrogado de resistencia primaria a trastuzumab.

3. Resistencia adquirida a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo

Los resultados expuestos en este trabajo han demostrado que la exposición continuada a trastuzumab en modelos celulares ocasiona resistencia al fármaco. En el análisis diferencial de expresión, realizado en las líneas BT-474 y BT-474.R, se han identificado 16 genes significativamente sobreexpresados en la línea BT-474.R respecto a la línea BT-474. De forma muy llamativa, del total de estos 16 genes, 13 pertenecen a la superfamilia de citoquinas (CXCL10, CCL5, CXCL11, IFNL1 e IFNL2) o están implicados en la activación de miembros de esta familia (IFIT3, IFI44, IFI6, IFIT1, IFI44L, IFIT2, OAS1, OASL).

3.1 Papel de las citoquinas en cáncer de mama

La carcinogénesis es un proceso producido por multitud de factores tanto intrínsecos a la célula tumoral como extrínsecos en relación con el microambiente tumoral. La implicación del microambiente tumoral, en este proceso, ha sido ampliamente descrito en los últimos años, los

factores secretados al medio extracelular, bien por las células del estroma o por el propio tumor, son capaces de conservar un equilibrio entre los procesos de proliferación e invasión y los procesos de muerte celular [216,217]. Las principales proteínas secretadas al medio extracelular son las citoquinas cuyo papel fundamental es el reclutamiento y activación de la respuesta inmune, sin embargo, cada vez toma mayor relevancia su implicación en procesos neoplásicos [105,106,218]. La implicación principal de las citoquinas en cáncer es la mediación de procesos de invasión y metástasis, así como evadir la respuesta inmune [218–220]. El trabajo publicado Fertig y colaboradores determina que el perfil de citoquinas producidas por el tumor es diferente en función de los subtipos de cáncer de mama, indicando que en el subtipo basal y HER2 predominan la producción de IL6 y CCL5 [221]. La implicación de estas dos citoquinas en cáncer de mama se centra fundamentalmente en la activación de procesos de proliferación celular, pero además la IL6 se ha descrito como mediador de la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo [222].

3.2 Implicación de CCL5 en la resistencia adquirida a trastuzumab

De todos los genes identificados en el array de expresión, destaca la sobreexpresión CCL5. Varios estudios han demostrado que las líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7, T47D y ZR-75, presentan altos niveles de CCL5, lo que provoca un incremento de la proliferación y de la capacidad de migración [223,224]. En líneas de cáncer de mama HER2 positivas, CCL5 controla la migración mediante la inducción fenotipo stem [112] y está implicado en procesos de metástasis disminuyendo los niveles de MMP9 [225,226].

En los últimos años varios trabajos indican que CCL5 podría estar implicado en la resistencia a distintos tratamientos en cáncer de mama. Korkaya y colaboradores definieron que incremento de la IL-6 en modelos celulares de cáncer de mama HER2 positivos, promoviendo la activación de AKT, STAT3 y NF- κ B y el incremento de CCL5, es responsable de la resistencia a trastuzumab [222]. Además, en modelos celulares de cáncer de mama subtipo luminal, la sobreexpresión de CCL5 se postula como un posible mecanismo de resistencia a tamoxifeno, [227]. Sin embargo, en cáncer de mama HER2 positivo, el grupo de Fertig, asocia la sobreexpresión de CCL5 a una mejor respuesta al tratamiento con trastuzumab [221].

Los estudios de modulación funcional de CCL5, realizados en nuestro trabajo, indican que CCL5 está implicado en la resistencia adquirida a trastuzumab en el modelo celular BT-474.R. El silenciamiento de CCL5 en la línea con resistencia adquirida ha demostrado que la disminución de los niveles de expresión de CCL5 en presencia de trastuzumab provoca una reversión de la resistencia a trastuzumab, además la inhibición farmacológica de la actividad de CCL5 mediante

maraviroc en combinación con trastuzumab, revierte la resistencia a esta terapia anti-HER2 en las células BT-474.R.

La inducción de CCL5 en las células tumorales se modula a través del factor de transcripción AP-1, activado por la unión del también factor de transcripción c-Jun, que a su vez es activado por la ruta de señalización celular JNK. La activación de AP-1 para la síntesis de CCL5 se produce principalmente por NF- κ B a través de AKT, y de la ruta de las MAPKs [111,112]. Las rutas de señalización sobre las que actúa la unión CCL5 son muy dispares. En células de cáncer de mama RE positivas con resistencia adquirida a tamoxifeno, la sobreexpresión de CCL5 provoca la fosforilación y activación de STAT3, que a su vez regula los niveles de CCL5 [227]. Murooka y colaboradores describe en modelos celulares de cáncer de mama RH positivos que el incremento de expresión de CCL5 promueve la proliferación celular a través de la activación de mTOR activando ciclina-D1 y MYC, regulando su expresión mediante un proceso de retroalimentación positiva [111,228].

Nuestros resultados indican que la resistencia a trastuzumab mediada por la sobreexpresión de CCL5 en la línea BT-474.R podría ser producida por la activación constitutiva de ERK en este modelo celular. En la línea celular sensible BT-474 el tratamiento con trastuzumab, este provoca una disminución de los niveles de activación de ERK; sin embargo, esto no ocurre en la línea resistente BT-474.R en la que el tratamiento con trastuzumab no afecta en la activación de ERK, lo que indica que en condiciones de resistencia, la ruta de ERK está siendo activada por otros mecanismos. Los estudios moleculares realizados en nuestro trabajo indican que el tratamiento con maraviroc más trastuzumab produce una disminución de la activación de ERK, sugiriendo que la reversión de la resistencia a trastuzumab provocada por el bloqueo de CCL5 está mediada por una reducción de los niveles de activación de ERK. Además, nuestros resultados indican que la resistencia adquirida a trastuzumab no estaría mediada por una activación de p-AKT (Thr 308), ya que el tratamiento con trastuzumab es capaz de inhibir su activación, y el tratamiento combinado con maraviroc y trastuzumab modula AKT de forma similar a trastuzumab solo.

Estos resultados concuerdan con otros estudios recientes en los se describe que la interacción de CCL5 con su receptor CCR5 provoca la activación directa de ERK y promueve un incremento de la migración celular [229,230], además la interacción de CCL5 con otros receptores, como CCR1, en modelos celulares cáncer de próstata, también provoca un incremento de la fosforilación de ERK que promueve la expresión de MMP2 y MMP9 en modelos de resistencia a taxanos (Kato et al. 2013).

De acuerdo a los resultados obtenidos, que postulan a CCL5 como mediador de la resistencia adquirida a trastuzumab en nuestro modelo celular, evaluamos el efecto de la adición de CCL5 exógeno (CCL5r) a en la línea sensible a trastuzumab BT-474, observándose que no existe un incremento de la resistencia. Este resultado pone de manifiesto que la resistencia adquirida a trastuzumab es un proceso complejo y que, muy posiblemente, la sobreexpresión de CCL5 deba de estar acompañada de otras alteraciones que, de forma global, generen resistencia a esta terapia anti-HER2. En el trabajo de Murooka y colaboradores del 2009 se identificó que en modelos celulares receptores hormonales positivos la adición de CCL5 exógeno no modificó la proliferación celular ni la activación de mTOR, aunque en un modelo con sobreexpresión del receptor CCR5, la adición de CCL5 exógeno si provocó una activación de la proliferación [111]. Varios estudios han identificado que se requiere la interacción entre CCL5 y CCR5 para observar los procesos de proliferación y migración descritos. Líneas celulares con mayor expresión del receptor CCR5 presentan una capacidad de migración 40 veces superior a la observada en líneas celulares con baja expresión del receptor. Además, este hecho se ha constatado en modelos murinos, demostrando que la activación de CCL5/CCR5 es imprescindible para la formación de tumores secundarios [115].

Nuestros hallazgos con CCL5 en el modelo BT-474.R de resistencia adquirida a trastuzumab sugieren que la sobreexpresión de esta quimioquina provoca resistencia al tratamiento con trastuzumab a través de la activación de ERK. Sin embargo, parte de nuestros resultados indican que los posibles receptores de CCL5 podrían estar implicados el proceso de resistencia. Además, existen otras citoquinas sobreexpresadas en este modelo de resistencia que no han sido estudiadas en este trabajo, y que también podrían contribuir a la resistencia adquirida a trastuzumab en este modelo celular.

3.3 Significado clínico de CCL5 en cáncer de mama

La sobreexpresión de CCL5 también se ha descrito en pacientes de cáncer de mama, correlacionándose con un mayor estadio de la enfermedad y la presencia de un mayor número de metástasis, asociándose a un peor pronóstico de la enfermedad (Esquivel-Velázquez et al. 2015; Yasuhara et al. 2015; Khalid et al. 2015; Stormes et al. 2005; Swamydas et al. 2013). El incremento de la concentración de CCL5 en plasma de pacientes con cáncer de mama también se ha asociado a con peor pronóstico de la enfermedad [224,233]. Además, los subtipos moleculares de cáncer de mama fenotipo basal y HER2 positivo presentan una mayor expresión de CCL5 en el componente tumoral, respecto a los otros subtipos moleculares [109,221].

Nuestros análisis a partir de muestras de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, en las que se han analizado los niveles de expresión de CCL5 en el componente tumoral demuestran que la sobreexpresión de CCL5 es un factor independiente de mal pronóstico de la enfermedad, asociándose de forma estadísticamente significativa a una menor supervivencia libre de enfermedad y menor supervivencia global en cáncer de mama precoz HER2 positivo y a una menor supervivencia global en cáncer de mama HER2 positivo avanzado.

Además, la sobreexpresión de esta quimioquina podría estar implicada en la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama precoz HER2 positivo. Nuestros hallazgos indican que aquellas pacientes que presentan alto niveles de expresión de CCL5 presentan de manera significativa peores tasas de respuesta a trastuzumab, no observándose ninguna respuesta patológica completa que presente altos niveles de expresión de CCL5. El análisis de la concentración de CCL5 en suero, realizado en este trabajo, en muestras previas al tratamiento con trastuzumab de pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo, evidenció que una elevada concentración de CCL5 en suero se correlaciona de forma significativa con una peor respuesta patológica al tratamiento neoadyuvante con trastuzumab. Además, el análisis de la evolución de CCL5 a lo largo de la enfermedad de las pacientes, comparando los niveles de expresión de CCL5 previos al tratamiento con trastuzumab y posteriores a la exposición al fármaco demostraron de forma estadísticamente significativa que la exposición continuada a trastuzumab ocasiona un incremento de la expresión de CCL5, correlacionándose con mayor tasa de recaída.

Sin embargo, CCL5 ha sido propuesto como un factor de buen pronóstico de respuesta al tratamiento con trastuzumab, debido a su función principal de quimioatracción de linfocitos y células del sistema inmune. El grupo de Denkert en 2015 determinó que la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en cáncer de mama HER2 positivo es un factor de predictivo de respuesta patológica completa al tratamiento neoadyuvante. Su estudio se basó en el análisis de una serie de 266 muestras de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo procedentes del estudio GeparSixto, en las que se evaluaron los TILs inter e intra-tumorales y se analizó la expresión de ARNm de 12 genes asociados con respuesta inmune, entre los que se encuentra CCL5. Aquellos tumores con alta infiltración linfocitaria se correlacionaban con una mayor expresión de los 12 genes estudiados y presentaban mayor tasas de respuestas patológicas completas [234].

Los niveles de CCL5 determinados en el trabajo de Denkert corresponden a los niveles de expresión totales, ya se analizan a partir de que ARNm, no pudiendo discriminar entre la expresión en el estroma, linfocitos y componente tumoral. Además, valoran el efecto paracrino

de CCL5, indicando que a mayor expresión de CCL5 existe mayor reclutamiento linfocitario. Mientras, que los hallazgos de nuestro trabajo, se basan en la importancia de la valoración de la expresión de CCL5 únicamente en el componente tumoral, indicando una menor respuesta patológica a trastuzumab cuando se incrementa la expresión.

El análisis de la correlación de los niveles de CCL5 con supervivencia global a partir de los datos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivas obtenidos de la base de datos pública TCGA, ha demostrado que existe una tendencia en la que las pacientes con sobreexpresión de CCL5 presentan una peor supervivencia. Además, el análisis de correlación de supervivencia global con los receptores habituales de CCL5, demostró que el incremento de CCR3 se asocia significativamente a una menor SG, y que existe una tendencia con el incremento de expresión de CCR5 y CCR1. Estos datos apoyan la hipótesis de que el incremento de CCL5 y su implicación en resistencia a trastuzumab o su incidencia supervivencia debe de estar asociada al incremento de CCR5 y sus otros receptores, CCR1 y CCR3.

Varios estudios identificaron que en tumores de mama HER2 positivos, la sobreexpresión de CCL5 se correlaciona con un incremento de la expresión del receptor CCR5 y también se constataba un incremento de los niveles de expresión del receptor CCR1 en los subtipos basal y HER2 positivos [115,221].

Nuestros hallazgos con CCL5 en muestras de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratadas con trastuzumab indican que la sobreexpresión de CCL5 en el componente tumoral infiltrante se comporta como un factor independiente predictivo de menor respuesta al tratamiento con trastuzumab y que se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad. Además, sugieren que en la resistencia adquirida a trastuzumab podría estar implicada la activación o el incremento de expresión de algún receptor de CCL5. En cualquier caso, la determinación de los niveles de expresión en componente tumoral mediante inmunohistoquímica o la determinación de su concentración en el suero, de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo candidatas a tratamiento con trastuzumab, podría ser empleado como predictor de la respuesta al tratamiento.

4. Terapias combinada trastuzumab e inhibidores de la ruta de señalización celular PI3K/AKT/mTOR

La hiperactivación de la ruta de señalización celular PI3K/AKT/mTOR, es un importante y descrito mecanismo de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama. En el ensayo fase II CHER-LOB, realizado en mujeres con cáncer de mama operable en el que se analiza el efecto de

la terapia combinada de quimioterapia convencional con trastuzumab, o con lapatinib o la combinación de quimioterapia convencional más trastuzumab y lapatinib, se identificó que la presencia de alteraciones en PI3K se asociaron a una menor respuesta, únicamente en el brazo que incluía ambas terapias anti-HER2 [235]; sin embargo, en el ensayo fase III CLEOPATRA, donde se comparaba la adición pertuzumab a la terapia convencional de docetaxel más trastuzumab en pacientes de cáncer de mama HER2 positivo metastásico, la presencia de alteraciones en PI3K se asoció a peor pronóstico de la enfermedad, independientemente del brazo de tratamiento [88].

En las líneas celulares con resistencia adquirida a trastuzumab generadas en nuestro trabajo se ha demostrado que existe una activación de la ruta PI3K/AKT/mTOR, independiente de la regulación mediada por HER2, de forma que el tratamiento con trastuzumab a 48 y 72 horas, no provoca una disminución de la activación de AKT en BT-474.R, SK-BR-3.R, AU565.R, ni de S6 en BT-474.R y SK-BR-3.R. Ante estos resultados, propusimos que el empleo de inhibidores específicos de mTOR, efector de la ruta PI3K/AKT/mTOR, podría provocar una disminución de actividad de la ruta, incidiendo en la resistencia adquirida a trastuzumab. Para lo cual, en este trabajo, hemos empleado tres fármacos inhibidores de la señalización de PI3K/AKT/mTOR con distintos mecanismos de acción y diferente capacidad de bloqueo de la actividad de la ruta.

La activación de PI3K, seguida de la activación de AKT provoca la liberación de mTOR del complejo mTORC1, que a su vez activa a las proteínas S6K1 y 4EBP1. Además el propio complejo presenta un mecanismo de retroalimentación negativa, que inactiva a AKT [236]. La proteína mTOR también se localiza en el complejo mTORC2, presentando capacidad de activación directa de AKT en el residuo Ser473, provocando la activación AKT y BAD [148]. A diferencia del complejo mTORC1, la activación de este complejo parece ser independiente de AKT, y estar controlado por RAS/MAPKs [148,236].

4.1 Efecto celular del tratamiento combinado de everolimus más trastuzumab

Everolimus (Afinitor, Novartis Pharma) es un derivado de la rapamicina con capacidad de inhibición del complejo mTORC1, aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama metastásico RE positivos y HER2 negativo. Los primeros ensayos fase I demostraron que este fármaco en combinación con trastuzumab provocaba una importante disminución de los niveles de activación de 4E-BP1 y S6, incidiendo en la proliferación celular [180,181,237], e incrementaba la inhibición de la proliferación celular en líneas celulares sensibles a trastuzumab [238]. Estos resultados no se han confirmado en cohortes de pacientes.

En el ensayo clínico fase III BOLERO-1 se concluyó que no existían diferencias significativas en la supervivencia libre de progresión entre el brazo con everolimus más trastuzumab/paclitaxel y el brazo control, de placebo más trastuzumab/paclitaxel, en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo [238,239]. No obstante, en el ensayo fase III BOLERO-3, realizado en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo avanzado en progresión al tratamiento con trastuzumab, se demostró que el grupo de everolimus más trastuzumab/vinorelbina ofrecía una mayor supervivencia libre de progresión frente al grupo control que recibió trastuzumab/vinorelbina [237,240]

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que el tratamiento combinado de trastuzumab y everolimus en las líneas sensibles a trastuzumab potencia, aunque no de manera significativa, el efecto de trastuzumab. Sin embargo, la combinatoria de tratamiento de everolimus más trastuzumab no demostró ningún efecto en la inhibición de la proliferación celular en las líneas con resistencia adquirida a trastuzumab, en ninguna de las concentraciones testadas. De hecho, nuestros resultados demuestran que en la línea con resistencia primaria, HCC1954, tanto la terapia combinada como el tratamiento individual con everolimus, incidieron en la viabilidad celular, revirtiendo de forma estadísticamente significativa la resistencia primaria a trastuzumab.

En los estudios BOLERO-1 y BOLERO-3 se demostró que la asociación de everolimus al tratamiento convencional ofrecía una mayor supervivencia libre de progresión en los pacientes que presentaban mutaciones en PI3K o pérdida de PTEN [241]. El efecto de reversión de la resistencia a trastuzumab observado en presencia de everolimus, puede ser debido a que la línea HCC1954 presenta la mutación H1047R del exón 20 de PI3K [153]. Pero esta reversión de la resistencia no ocurre en el tratamiento combinado de everolimus más trastuzumab en la línea JIMT1 que, de acuerdo a lo descrito por O'Brien, presenta pérdida de PTEN [153].

El efecto limitado de everolimus observado en nuestros resultados podría deberse a que este fármaco únicamente presenta capacidad de inhibición del complejo mTORC1 y no del complejo mTORC2, lo que provoca que mTORC2 continúe activando a AKT (Ser 473) y una sobreactivación de la ruta [242,243]. Además, la inhibición de mTORC1 provoca un bucle de reactivación de la cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR debido a la inhibición de S6, que regula negativamente la activación de PI3K [244].

4.2 Efecto celular del tratamiento combinado de BEZ235 más trastuzumab

BEZ235 (Novartis Pharma) es un inhibidor de la ruta PI3K/AKT/mTOR con capacidad de inhibición dual de PI3K y mTOR debido a la alta similitud de los dominios tirosina quinasa de ambas proteínas [245], y que actualmente se encuentra en ensayo clínico I/II para el tratamiento de cáncer de mama metastásico [182].

El tratamiento combinado de BEZ235 con trastuzumab demostró en nuestro trabajo que potencia el efecto de trastuzumab a altas concentraciones de BEZ235 en las líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas sensibles al tratamiento con trastuzumab. Mientras que en las líneas con resistencia adquirida a trastuzumab generadas, la combinatoria de tratamiento BEZ235 y trastuzumab únicamente demostró impacto estadísticamente significativo en proliferación celular en BT-474.R, revirtiendo la resistencia a trastuzumab. Esta reversión de la resistencia podría ser debida a que esta línea presentan un incremento de la activación de S6, independientemente del tratamiento con trastuzumab, y que podría ser bloqueado por la combinatoria de trastuzumab y BEZ235, revirtiendo así la resistencia. Sin embargo, esta misma activación se detecta en la línea SK-BR-3.R, y la terapia combinada de BEZ235 y trastuzumab no incide en la resistencia.

Los primeros ensayos pre-clínicos han demostrado que el tratamiento con BEZ235 provoca un importante efecto antitumoral en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas sensibles a trastuzumab. Además, el trabajo de O'Brien demuestra que el tratamiento combinado con de BEZ235 junto con trastuzumab es capaz de revertir la resistencia a trastuzumab en la resistencia adquirida a esta terapia anti-HER2 de la línea BT-474 generada por su grupo [183]. También en modelos de ratón de líneas resistentes a trastuzumab, la terapia combinada del inhibidor dual BEZ235 con trastuzumab demostró un inhibición del crecimiento celular [246]. Estos mismos resultados se han descrito en modelos celulares de cáncer gástrico con amplificación de HER2, en los que se ha demostrado que el tratamiento con BEZ235 en combinación con trastuzumab potencia el efecto de trastuzumab en líneas sensibles [247].

Sin embargo, nuestros resultados demostraron en la línea resistente primaria HCC1954 que la combinación con trastuzumab y BEZ235 a cualquiera de las concentraciones testadas provoca de manera significativa la reversión de la resistencia a trastuzumab, siendo más significativa que la reversión provocada por el tratamiento combinado con everolimus. Dado que en esta línea, como ya se ha mencionado, presenta mutación en PI3K, los hallazgos observados sugieren que el bloqueo dual de PI3K y mTOR incide de manera significativa en la viabilidad celular y revierte la resistencia a trastuzumab en presencia de mutaciones activadoras de PI3K.

Estos resultados correlacionan con diferentes trabajos que indican que la activación constitutiva de PI3K debida a la presencia de las mutaciones E545K y H1047R o la pérdida de PTEN, se ve revertido de forma significativa por el tratamiento de BE235 en combinación con lapatinib [248] o con trastuzumab [128,249].

Sin embargo, en la línea JIMT1, ni el tratamiento combinado de BEZ235 más trastuzumab, afectaron a la proliferación celular ni revirtiendo la resistencia a trastuzumab. Este resultado puede deberse a que esta línea no solo presenta pérdida de PTEN, también presenta sobreexpresión de mucina 4 (MUC4) [250]. Las mucinas se han descrito como mecanismo de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama, debido a que impiden la unión de trastuzumab al receptor HER2 y estabilizan el heterodímero formado por HER2/HER3 [122,250,251].

El efecto limitado de la terapia combinada de trastuzumab más BEZ235 en la reversión de la resistencia a trastuzumab en las líneas celulares con resistencia adquirida generadas en nuestro trabajo puede ser debido a que este inhibidor dual, al igual que everolimus, solo bloquea la acción del complejo mTORC1. Por este motivo se sigue produciendo una activación de AKT Ser 473 por parte del complejo mTORC2, que no se ve afectada por la inhibición de PI3K [242,243]. Además, se ha descrito que la inhibición dual PI3K/mTOR de este fármaco produce una activación compensatoria de ERK debido a la activación de receptores tirosina quinasa como IGF-1R [246,252].

4.3 Efecto celular y molecular del tratamiento combinado de INK128 más trastuzumab

Posteriormente a los inhibidores antes descritos, se han desarrollado fármacos de segunda generación con capacidad de inhibición de los dos complejos de mTOR, entre los que destaca INK128 (Intellikine, Millennium Pharmaceuticals). Se trata de un inhibidor competitivo del dominio ATP de mTOR con capacidad de bloquear simultáneamente la actividad de los complejos mTORC1 y mTORC2, que actualmente se encuentra en ensayos clínicos fase I en combinación con paclitaxel con o sin trastuzumab en tumores sólidos avanzados [253].

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que el tratamiento con trastuzumab en combinación con INK128 5 nM provoca una disminución estadísticamente significativa de la proliferación celular en todas las líneas con resistencia adquirida generada, siendo capaz de revertir la resistencia adquirida a esta terapia anti-HER2. Además, a nivel molecular el tratamiento combinado de trastuzumab más INK128 50 nM demuestra ser superior a los tratamientos individuales, siendo capaz de disminuir la activación de los efectores de la ruta

PI3K/AKT/mTOR que el trastuzumab por sí solo no era capaz de inhibir, y que ocasionaba que el tratamiento con trastuzumab fuera insuficiente para disminuir la activación de la ruta.

En las líneas sensibles al tratamiento con trastuzumab la asociación de INK128 al tratamiento con trastuzumab potenció el efecto de la terapia anti-HER2, disminuyendo significativamente la proliferación celular en las líneas sensibles SK-BR-3, AU565 y EFM19-2A. Además, el tratamiento con INK128 y su combinación con trastuzumab demostró tener la capacidad a nivel molecular de bloquear ambos complejos de mTOR, disminuyendo la fosforilación de todos los efectores analizados, por lo que potencia el efecto de inhibición de la ruta PI3K/AKT/mTOR del tratamiento con trastuzumab.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo coinciden con hallazgos del trabajo de García-García, que indican que el tratamiento combinado de lapatinib con INK128 presenta un efecto sinérgico, disminuyendo la viabilidad celular y suprimiendo la fosforilación de la señalización de PI3K/AKT/mTOR en diferentes líneas celulares resistentes a trastuzumab y lapatinib, además de demostrar un potente efecto antitumoral en modelos *in vivo* de tumores de mama refractarios a terapia anti-HER2 [184].

En la línea resistente primaria a trastuzumab, HCC1954, también el tratamiento de trastuzumab más INK128 provoca de forma significativa la reversión de la resistencia a trastuzumab. Sin embargo, el tratamiento individual demostró no afectar la proliferación celular, al contrario de lo ocurría con el tratamiento con BEZ235. Estos datos sugieren que en presencia de mutaciones puntuales activadoras de PI3K, el tratamiento con BEZ235 en combinación con trastuzumab sería superior al tratamiento combinado de INK128 más la terapia anti-HER2 [128,248,249]. El efecto a nivel molecular demuestra que el tratamiento único del inhibidor de mTOR y su combinación con trastuzumab es capaz de bloquear el complejo mTORC1, disminuyendo la fosforilación de S6 y 4EBP1, pero no provocando inhibición del complejo mTORC2, debido que no disminuye la activación de p-AKT (Ser 473). Sin embargo, los hallazgos del trabajo de García-García demuestran que el tratamiento con INK128 o su combinación con lapatinib provoca una inhibición completa de la fosforilación de S6, 4E-BP1 y de la forma fosforilada AKT (Ser 473) en la línea HCC1954 [184].

En nuestro trabajo la línea JIMT1 no se ve afectada por ninguna condición de tratamiento de INK128 más trastuzumab, lo que apoya los datos expuesto anteriormente que indican que esta línea, además de la pérdida de PTEN podría presentar mutaciones en MUC4 que estabilizarían el heterodímero HER2/HER3 y que la inhibición con este tipo de fármacos fuera ineficaz para revertir la resistencia [250]. En el caso de este modelo celular sería necesario profundizar en el

estudio de sus posibles mecanismos de resistencia a trastuzumab. Además, molecularmente no se observa ninguna modificación de su patrón de fosforilación en presencia o ausencia de los tratamientos, resultados que apoyan que esta línea presenta un mecanismo de resistencia a trastuzumab independiente de la PI3K/AKT/mTOR y que provoca la activación de la ruta aún en presencia de inhibidores de la ruta.

Nuestros resultados obtenidos a partir de líneas células de cáncer de mama sensibles, con resistencia adquirida y resistencia primaria a trastuzumab, expuestas a terapias combinadas de inhibidores específicos de vía de señalización de mTOR con trastuzumab sugieren que esta terapia combinada favorece la reversión de la resistencia a trastuzumab. El tratamiento con el inhibidor INK128 ha demostrado ser superior, en terapia combinada con trastuzumab, a los otros dos inhibidores analizados, everolimus o BEZ235, en la reversión de la resistencia adquirida a trastuzumab. Sin embargo, en presencia de mutaciones activadores de PI3K, el tratamiento individual y combinado de BEZ235 ha demostrado ser superior al tratamiento con INK128 y everolimus.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir:

1. Las líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas presentan diferente sensibilidad al tratamiento con trastuzumab. Las líneas HCC1569, HCC1954 y JIMT1 presentan resistencia primaria, mientras que las líneas BT-474, SK-BR-3, AU565 y EFM19-2A son sensibles al tratamiento con trastuzumab.
2. A partir de los datos disponibles en *Cancer Cell Encyclopedia*, las líneas con resistencia primaria a trastuzumab muestran ganancia de la región cromosómica 8p11.21-8q22.3, que incluye a los genes UBR5 (8q22.3), RGS22 (8q22.2), STK3 (8q22.2), PDP1 (8q22.1), SNAI2 (8q11.21) y C8orf4 (8p11.21).
3. Las líneas resistentes primarias a trastuzumab presentan amplificación de los genes PDP1 (8q22.1) y MYC (8q24.21), mientras que las líneas celulares sensibles al fármaco muestran dotación génica normal para el gen PDP1 y menor ganancia del gen MYC.
4. La amplificación de PDP1 y MYC se comporta como un marcador de resistencia primaria estadísticamente significativo en pacientes de cáncer de mama precoz HER2 positivo en tratamiento neoadyuvante que incluye trastuzumab. Esta resistencia se traduce en una menor tasa de respuestas patológicas completas.
5. La exposición continuada a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivas sensibles este tratamiento genera resistencia adquirida al fármaco en un periodo de tiempo comprendido entre los 2 y 8 meses.
6. La resistencia adquirida a trastuzumab generada en las líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo es estable, y no induce ningún cambio relevante en el fenotipo clínico ni en las características morfológicas de las células.
7. El análisis de expresión génica diferencial en BT-474 indica una sobreexpresión de 16 genes, que incluyen tres quimioquinas, destacando a CCL5 como la quimioquina más sobreexpresada con implicación en cáncer de mama.
8. Los estudios funcionales mediante manipulación génica, confirman el papel de CCL5 en la resistencia adquirida a trastuzumab en BT-474.

9. La modulación farmacológica de maraviroc reproduce los hallazgos del modelo de silenciamiento génico, sugiriendo un abordaje terapéutico de reversión de la resistencia adquirida en BT-474.
10. CCL5 está implicado en la resistencia adquirida a trastuzumab en BT-474 mediante la activación mantenida de la ruta de señalización celular mediada por ERK, no siendo modulable por trastuzumab.
11. El mecanismo último asociado a la sobreexpresión de CCL5 no se ha podido determinar a nivel molecular.
12. La sobreexpresión de CCL5 en pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo en esquema de neoadyuvancia que contiene trastuzumab se asocia de manera estadísticamente significativa a una menor tasa de respuestas patológicas completas.
13. La sobreexpresión de CCL5 en cáncer de mama precoz se asocia de forma estadísticamente significativa a una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global; siendo un factor pronóstico independiente. Este valor de CCL5 en supervivencia libre de enfermedad sugiere que actúa como biomarcador predictivo de resistencia a trastuzumab.
14. La detección de CCL5 en suero de pacientes de cáncer de mama precoz HER2 positivo en neoadyuvancia abre la oportunidad de su medida en pacientes mediante métodos mínimamente invasivos.
15. En cáncer de mama avanzado HER2 positivo y tratado con trastuzumab, la sobreexpresión de CCL5 es un factor de pronóstico estadísticamente significativo de menor supervivencia global.
16. La expresión de CCL5 se ve incrementada de forma estadísticamente significativa con la exposición a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo tratadas en neoadyuvancia. En pacientes con cáncer de mama HER2 positivo que han progresado al tratamiento con trastuzumab, CCL5 también se incrementa de forma significativa.
17. La activación de la ruta de señalización celular de PI3K/AKT/mTOR se ha descrito como un mecanismo de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo. En los

modelos celulares empleados en este trabajo, HCC1954, JIMT1, BT-474, SK-BR-3, AU565 y EFM19-2A presentaron mayor activación de esta ruta por presencia de mutación de PI3K, pérdida de PTEN o incremento de las formas totales o fosforiladas de AKT y/o S6.

18. La inhibición de PI3K/AKT/mTOR mediante el inhibidor competitivo del dominio ATP de mTORC1 y mTORC2, INK128, es capaz de revertir la resistencia adquirida a trastuzumab en todos los modelos generados, y en la línea resistente primaria HCC1954.
19. El tratamiento con el inhibidor BEZ235, con capacidad de inhibición dual de PI3K y mTORC1, revierte la resistencia primaria a trastuzumab en la línea HCC1954 de forma más relevante, probablemente asociado a la presencia de la mutación activadora H1047R de PI3K en esta línea. Sin embargo, BEZ235 tiene una capacidad limitada de reversión de la resistencia en las líneas con resistencia adquirida a trastuzumab.
20. El tratamiento con everolimus, inhibidor de mTORC1, tiene actividad parcial de reversión de la resistencia a trastuzumab en el modelo de resistencia primaria HCC1954, siendo escasamente activo en la resistencia adquirida, probablemente en relación a la mutación de PI3K antes comentada.

Bibliografía

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;**65**:5–29.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;**136**:E359–86.
3. Bray F, Ren J-S, Masuyer E *et al.* Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2013;**132**:1133–45.
4. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T *et al.* European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol* 2015;**26**:779–86.
5. De Sanidad M, Consumo Y. La situación del cáncer en España Planificación Planificación Sanitaria Planificación Sanitaria.
6. Lacey J V, Devesa SS, Brinton LA. Recent trends in breast cancer incidence and mortality. *Environ Mol Mutagen* 2002;**39**:82–8.
7. Gnanapragasam VJ. Unlocking the molecular archive: the emerging use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for biomarker research in urological cancer. *BJU Int* 2010;**105**:274–8.
8. Goldstein, MD NS, Ferkowicz, MT(ASCP), PathA(AAPA) M, Odish, HTL(IHQ) E *et al.* Minimum Formalin Fixation Time for Consistent Estrogen Receptor Immunohistochemical Staining of Invasive Breast Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2003;**120**:86–92.
9. BLOOM HJ, RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957;**11**:359–77.
10. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;**31**:209–23.
11. Frierson HF, Wolber RA, Berean KW *et al.* Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1995;**103**:195–8.
12. Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer* 1994;**73**:2765–70.
13. Dalton LW, Pinder SE, Elston CE *et al.* Histologic Grading of Breast Cancer: Linkage of Patient Outcome with Level of Pathologist Agreement. *Mod Pathol* 2000;**13**:730–5.
14. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ *et al.* *WHO Classification of Tumours of the Breast.*, 2012.
15. Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti A. AJCC Cancer Staging Manual | Stephen Edge | Springer. *Springer* 2009.
16. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M *et al.* Randomized Multicenter Trial of Sentinel Node Biopsy Versus Standard Axillary Treatment in Operable Breast Cancer: The ALMANAC Trial. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2006;**98**:599–609.

17. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature* 2008;**452**:548–52.
18. Ross JS. Multigene Classifiers, Prognostic Factors, and Predictors of Breast Cancer Clinical Outcome. *Adv Anat Pathol* 2009;**16**:204–15.
19. Welboren W-J, Stunnenberg HG, Sweep FCGJ *et al.* Identifying estrogen receptor target genes. *Mol Oncol* 2007;**1**:138–43.
20. Romano A, Adriaens M, Kuenen S *et al.* Identification of novel ER- α target genes in breast cancer cells: Gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17 β -estradiol and tamoxifen. *Mol Cell Endocrinol* 2010;**314**:90–100.
21. Conneely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;**8**:205–14.
22. Harris L, Fritsche H, Mennel R *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2007;**25**:5287–312.
23. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA *et al.* Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. *J Clin Oncol* 1995;**13**:513–29.
24. Crowe JP, Hubay CA, Pearson OH *et al.* Estrogen receptor status as a prognostic indicator for stage I breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1982;**2**:171–6.
25. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010;**134**:e48-72.
26. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF *et al.* The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *Oncologist* 2009;**14**:320–68.
27. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A *et al.* Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992;**10**:1049–56.
28. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;**25**:118–45.
29. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2013;**31**:3997–4013.
30. Albanell J, Andreu X, Calasanz MJ *et al.* Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol* 2009;**11**:363–75.

31. Gerdes J, Li L, Schlueter C *et al.* Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;**138**:867–73.
32. Urruticoechea A. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005;**23**:7212–20.
33. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12155 patients. *Br J Cancer* 2007;**96**:1504–13.
34. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T *et al.* Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005;**205**:248–54.
35. Shackney SE, Silverman JF. Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol* 2003;**10**:278–90.
36. Perou CM, Sørli T, Eisen MB *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;**406**:747–52.
37. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* 2001;**98**:10869–74.
38. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;**22**:1736–47.
39. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;**5**:5–23.
40. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007;**8**:R76.
41. Prat A, Parker JS, Karginova O *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;**12**:R68.
42. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer. *Am J Pathol* 2013;**183**:1113–24.
43. Prat A, Ellis MJ, Perou CM. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;**9**:48–57.
44. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;**415**:530–6.
45. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2009;**360**:790–800.

46. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ *et al.* A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2002;**347**:1999–2009.
47. Paik S, Shak S, Tang G *et al.* A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2004;**351**:2817–26.
48. Kirk R. Risk factors: Oncotype DX® assay predicts local recurrence in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;**7**:300–300.
49. Paik S, Tang G, Shak S *et al.* Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2006;**24**:3726–34.
50. Martei YM, Matro JM. Identifying patients at high risk of breast cancer recurrence: strategies to improve patient outcomes. *Breast cancer (Dove Med Press)* 2015;**7**:337–43.
51. Esteva FJ. Prognostic Role of a Multigene Reverse Transcriptase-PCR Assay in Patients with Node-Negative Breast Cancer Not Receiving Adjuvant Systemic Therapy. *Clin Cancer Res* 2005;**11**:3315–9.
52. Chia SK, Bramwell VH, Tu D *et al.* A 50-Gene Intrinsic Subtype Classifier for Prognosis and Prediction of Benefit from Adjuvant Tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2012;**18**:4465–72.
53. Nielsen TO, Parker JS, Leung S *et al.* A Comparison of PAM50 Intrinsic Subtyping with Immunohistochemistry and Clinical Prognostic Factors in Tamoxifen-Treated Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2010;**16**:5222–32.
54. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E *et al.* Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *J Clin Oncol* 2013;**31**:2783–90.
55. Gradishar W, Salerno KE. NCCN Guidelines Update: Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;**14**:641–4.
56. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet* 2016, DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
57. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R *et al.* Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;**14**:324–54.
58. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;**24**:2206–23.
59. Truong PT, Olivotto IA, Whelan TJ *et al.* Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 16. Locoregional post-mastectomy radiotherapy. *CMAJ* 2004;**170**:1263–73.
60. Morrow M. Breast conservation and negative margins: how much is enough? *The Breast* 2009;**18**:S84–6.

61. Sedlmayer F, Zehentmayr F, Fastner G. Partial breast re-irradiation for local recurrence of breast carcinoma: Benefit and long term side effects. *The Breast* 2013;**22**:S141–6.
62. von Minckwitz G, Fontanella C. Selecting the neoadjuvant treatment by molecular subtype: How to maximize the benefit? *The Breast* 2013;**22**:S149–51.
63. Specht J, Galow JR. Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Breast Cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;**19**:222–8.
64. Gluck S. Adjuvant Chemotherapy for Early Breast Cancer: Optimal Use of Epirubicin. *Oncologist* 2005;**10**:780–91.
65. Launchbury AP, Habboubi N. Epirubicin and doxorubicin: a comparison of their characteristics, therapeutic activity and toxicity. *Cancer Treat Rev* 1993;**19**:197–228.
66. Bria E, Nistico C, Cuppone F *et al.* Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Cancer* 2006;**106**:2337–44.
67. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD *et al.* Preoperative Chemotherapy: Updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol* 2008;**26**:778–85.
68. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C *et al.* Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet (London, England)* 2012;**379**:432–44.
69. Paik S, Tang G, Shak S *et al.* Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2006;**24**:3726–34.
70. Cheang MCU, Voduc KD, Tu D *et al.* Responsiveness of Intrinsic Subtypes to Adjuvant Anthracycline Substitution in the NCIC.CTG MA.5 Randomized Trial. *Clin Cancer Res* 2012;**18**:2402–12.
71. Lønning PE. Evolution of endocrine adjuvant therapy for early breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;**19**:S19–30.
72. Stuart-Harris R, Davis A. Optimal adjuvant endocrine therapy for early breast cancer. *Women's Heal* 2010;**6**:383–98.
73. Wood AJJ, Riggs BL, Hartmann LC. Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *N Engl J Med* 2003;**348**:618–29.
74. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL *et al.* Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst* 2005;**97**:1652–62.
75. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, Thürlimann B, Keshaviah A *et al.* A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005;**353**:2747–57.

76. Lønning PE. Aromatase inhibitors and inactivators for breast cancer treatment. *Eur J Cancer* 2002;**38 Suppl** 6:S47-8.
77. Goss PE, Ingle JN, Martino S *et al.* Randomized Trial of Letrozole Following Tamoxifen as Extended Adjuvant Therapy in Receptor-Positive Breast Cancer: Updated Findings from NCIC CTG MA.17. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2005;**97**:1262–71.
78. Baselga J, Campone M, Piccart M *et al.* Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;**366**:520–9.
79. Turner NC, Ro J, André F *et al.* Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2015;**373**:209–19.
80. Finn RS, Crown JP, Lang I *et al.* The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015;**16**:25–35.
81. Ehab M, Elbaz M. Profile of palbociclib in the treatment of metastatic breast cancer. *Breast cancer (Dove Med Press* 2016;**8**:83–91.
82. Mukai H. Targeted Therapy in Breast Cancer: Current Status and Future Directions. *Jpn J Clin Oncol* 2010;**40**:711–6.
83. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S *et al.* Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;**344**:783–92.
84. Perez EA, Baweja M. HER2-Positive Breast Cancer: Current Treatment Strategies. *Cancer Invest* 2008;**26**:545–52.
85. Jahanzeb M. Adjuvant Trastuzumab Therapy for HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2008;**8**:324–33.
86. Baselga J, Perez EA, Pienkowski T *et al.* Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist* 2006;**11 Suppl** 1:4–12.
87. Geyer CE, Forster J, Lindquist D *et al.* Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2006;**355**:2733–43.
88. Baselga J, Cortés J, Kim S-B *et al.* Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 2012;**366**:109–19.
89. Martínez MT, Pérez-Fidalgo JA, Martín-Martorell P *et al.* Treatment of HER2 positive advanced breast cancer with T-DM1: A review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;**97**:96–106.
90. Petitjean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL *et al.* TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007;**26**:2157–65.

91. Bertheau P, Espié M, Turpin E *et al.* TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology* 2008;**75**:132–9.
92. Pharoah PDP, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999;**80**:1968–73.
93. Königsberg R, Rögelsperger O, Jäger W *et al.* Cell Cycle Dysregulation Influences Survival in High Risk Breast Cancer Patients. *Cancer Invest* 2008;**26**:734–40.
94. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA *et al.* Cyclin E and Survival in Patients with Breast Cancer. *N Engl J Med* 2002;**347**:1566–75.
95. Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortés J *et al.* Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:3761–6.
96. Abukhdeir AM, Vitolo MI, Argani P *et al.* Tamoxifen-stimulated growth of breast cancer due to p21 loss. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:288–93.
97. Mukherjee S, Conrad SE. c-Myc Suppresses p21WAF1/CIP1 Expression during Estrogen Signaling and Antiestrogen Resistance in Human Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* 2005;**280**:17617–25.
98. Dang C V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999;**19**:1–11.
99. Albihn A, Johnsen JI, Henriksson MA. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res* 2010;**107**:163–224.
100. Kang J, Sergio CM, Sutherland RL *et al.* Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. *BMC Cancer* 2014;**14**:32.
101. Xu J, Chen Y, Olopade OI. MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* 2010;**1**:629–40.
102. Chen Y, Olopade OI. MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;**8**:1689–98.
103. Whitfield JR, Soucek L. Tumor microenvironment: becoming sick of Myc. *Cell Mol Life Sci* 2012;**69**:931–4.
104. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;**144**:646–74.
105. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet (London, England)* 2001;**357**:539–45.
106. Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2006;**25**:357–71.

107. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF *et al.* International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:145–76.
108. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;**12**:121–7.
109. Velasco-Velázquez M, Xolalpa W, Pestell RG. The potential to target CCL5/CCR5 in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2014;**18**:1265–75.
110. Khalid A, Wolfram J, Ferrari I *et al.* Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer. *Mini Rev Med Chem* 2015;**15**:1063–72.
111. Murooka TT, Rahbar R, Fish EN. CCL5 promotes proliferation of MCF-7 cells through mTOR-dependent mRNA translation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;**387**:381–6.
112. Jiao X, Katiyar S, Willmarth NE *et al.* c-Jun Induces Mammary Epithelial Cellular Invasion and Breast Cancer Stem Cell Expansion. *J Biol Chem* 2010;**285**:8218–26.
113. Kanmogne G, Woollard S. Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond. *Drug Des Devel Ther* 2015;**9**:5447.
114. Hütter G, Bodor J, Ledger S *et al.* CCR5 Targeted Cell Therapy for HIV and Prevention of Viral Escape. *Viruses* 2015;**7**:4186–203.
115. Velasco-Velázquez M, Jiao X, De La Fuente M *et al.* CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells. *Cancer Res* 2012;**72**:3839–50.
116. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L *et al.* The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* **312**:513–6.
117. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007;**26**:3291–310.
118. Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst* 2015;**11**:1946–54.
119. Baselga J, Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2001;**12 Suppl 1**:S35–41.
120. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD *et al.* Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 1999;**26**:60–70.
121. Gagliato D de M, Jardim DLF, Marchesi MSP *et al.* Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget* 2016, DOI: 10.18632/oncotarget.7043.
122. Fessler SP, Wotkowicz MT, Mahanta SK *et al.* MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2009;**118**:113–24.
123. Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011;**11**:263–75.

124. González-Alonso P, Cristóbal I, Zazo S *et al.* Recent Insights into the Development of Preclinical Trastuzumab-Resistant HER2+ Breast Cancer Models. *Curr Med Chem* 2016.
125. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;**366**:883–92.
126. Chien J, Kuang R, Landen C *et al.* Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer: the role of tumor microenvironment. *Front Oncol* 2013;**3**:251.
127. Montero JC, Rodríguez-Barrueco R, Ocana A *et al.* Neuregulins and Cancer. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:3237–41.
128. Chakrabarty A, Rexer BN, Wang SE *et al.* H1047R phosphatidylinositol 3-kinase mutant enhances HER2-mediated transformation by heregulin production and activation of HER3. *Oncogene* 2010;**29**:5193–203.
129. Cabal M, García-Tejido P, Fernández-Pérez Y *et al.* Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It. *Clin Med Insights Oncol* 2016;**10**:21.
130. Arribas J, Baselga J, Pedersen K *et al.* p95HER2 and Breast Cancer. *Cancer Res* 2011;**71**:1515–9.
131. Scaltriti M, Rojo F, Ocana A *et al.* Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2007;**99**:628–38.
132. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B *et al.* Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med* 2012;**18**:221–3.
133. Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J *et al.* Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 2010;**466**:869–73.
134. Teng YH-F, Tan W-J, Thike A-A *et al.* Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res* 2011;**13**:R35.
135. González-Alonso P, Chamizo C, Moreno V *et al.* Pyrosequencing-Based Assays for Rapid Detection of HER2 and HER3 Mutations in Clinical Samples Uncover an E332E Mutation Affecting HER3 in Retroperitoneal Leiomyosarcoma. *Int J Mol Sci* 2015;**16**:19447–57.
136. Kancha RK, von Bubnoff N, Bartosch N *et al.* Differential Sensitivity of ERBB2 Kinase Domain Mutations towards Lapatinib. Ouchi T (ed.). *PLoS One* 2011;**6**:e26760.
137. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL *et al.* Met Receptor Contributes to Trastuzumab Resistance of Her2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 2008;**68**:1471–7.
138. Blumenschein GR, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the Hepatocyte Growth Factor-cMET Axis in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 2012;**30**:3287–96.

139. Lu Y, Zi X, Zhao Y *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001;**93**:1852–7.
140. Wang Y. Inhibition of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) signaling and tumor cell growth by a fully human neutralizing anti-IGF-IR antibody. *Mol Cancer Ther* 2005;**4**:1214–21.
141. Nagata Y, Lan K-H, Zhou X *et al.* PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;**6**:117–27.
142. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC *et al.* Loss of Phosphatase and Tensin Homolog or Phosphoinositol-3 Kinase Activation and Response to Trastuzumab or Lapatinib in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Locally Advanced Breast Cancers. *J Clin Oncol* 2011;**29**:166–73.
143. Pandolfi PP. Breast Cancer — Loss of PTEN Predicts Resistance to Treatment. *N Engl J Med* 2004;**351**:2337–8.
144. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT *et al.* Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011;**13**:224.
145. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A *et al.* High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science (80-)* 2004;**304**:554–554.
146. Nahta R, Yu D, Hung M-C *et al.* Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;**3**:269–80.
147. Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. *Cancer Sci* 2011;**102**:1–8.
148. Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway in Breast Cancer. *Oncologist* 2011;**16**:404–14.
149. Carpten JD, Faber AL, Horn C *et al.* A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007;**448**:439–44.
150. Neve RM, Chin K, Fridlyand J *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006;**10**:515–27.
151. Riaz M, van Jaarsveld MTM, Hollestelle A *et al.* miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast Cancer Res* 2013;**15**:R33.
152. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;**65**:55–63.
153. O'Brien NA, Browne BC, Chow L *et al.* Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib. *Mol Cancer Ther* 2010;**9**:1489–502.

154. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V *et al.* Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**:e56.
155. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* 2010;**26**:2363–7.
156. Huber W, Carey VJ, Gentleman R *et al.* Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 2015;**12**:115–21.
157. Alonso R, Salavert F, Garcia-Garcia F *et al.* Babelomics 5.0: functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res* 2015;**43**:W117-21.
158. Montaner D, Dopazo J. Multidimensional gene set analysis of genomic data. Hoheisel J (ed.). *PLoS One* 2010;**5**:e10348.
159. Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* 2015;**43**:D1049-56.
160. Kanehisa M, Goto S, Sato Y *et al.* Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:D199-205.
161. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;**29**:e45.
162. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994;**32**:5–8.
163. Ogston KN, Miller ID, Payne S *et al.* A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast* 2003;**12**:320–7.
164. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;**4**:844–7.
165. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;**344**:783–92.
166. Esteva FJ, Valero V, Booser D *et al.* Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;**20**:1800–8.
167. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;**353**:1659–72.
168. Slamon D, Eiermann W, Robert N *et al.* Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2011;**365**:1273–83.

169. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF *et al.* Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998;**16**:2659–71.
170. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N *et al.* Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;**66**:1630–9.
171. Kute T, Lack CM, Willingham M *et al.* Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry* 2004;**57A**:86–93.
172. Chan CT, Metz MZ, Kane SE. Differential sensitivities of trastuzumab (Herceptin®)-resistant human breast cancer cells to phosphoinositide-3 kinase (PI-3K) and epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* 2005;**91**:187–201.
173. Barretina J, Caponigro G, Stransky N *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;**483**:603–7.
174. Tsuji K, Kawauchi S, Saito S *et al.* Breast cancer cell lines carry cell line-specific genomic alterations that are distinct from aberrations in breast cancer tissues: Comparison of the CGH profiles between cancer cell lines and primary cancer tissues. *BMC Cancer* 2010;**10**:15.
175. Greshock J, Nathanson K, Martin A-M *et al.* Cancer cell lines as genetic models of their parent histology: analyses based on array comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 2007;**67**:3594–600.
176. Gogas H, Kotoula V, Alexopoulou Z *et al.* MYC copy gain, chromosomal instability and PI3K activation as potential markers of unfavourable outcome in trastuzumab-treated patients with metastatic breast cancer. *J Transl Med* 2016;**14**:136.
177. Perez EA, Jenkins RB, Dueck AC *et al.* C-MYC Alterations and Association With Patient Outcome in Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer From the North Central Cancer Treatment Group N9831 Adjuvant Trastuzumab Trial. *J Clin Oncol* 2011;**29**:651–9.
178. Seitz S, Frege R, Jacobsen A *et al.* A network of clinically and functionally relevant genes is involved in the reversion of the tumorigenic phenotype of MDA-MB-231 breast cancer cells after transfer of human chromosome 8. *Oncogene* 2005;**24**:869–79.
179. Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S *et al.* Antibody validation. *Biotechniques* 2010;**48**:197–209.
180. Jerusalem G, Fasolo A, Dieras V *et al.* Phase I trial of oral mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab and vinorelbine in pre-treated patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;**125**:447–55.
181. Tabernero J, Rojo F, Calvo E *et al.* Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008;**26**:1603–10.

182. Leung E, Kim JE, Rewcastle GW *et al.* Comparison of the effects of the PI3K/mTOR inhibitors NVP-BEZ235 and GSK2126458 on tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2011;**11**:938–46.
183. O'Brien NA, McDonald K, Tong L *et al.* Targeting PI3K/mTOR overcomes resistance to HER2-targeted therapy independent of feedback activation of AKT. *Clin Cancer Res* 2014;**20**:3507–20.
184. García-García C, Ibrahim YH, Serra V *et al.* Dual mTORC1/2 and HER2 blockade results in antitumor activity in preclinical models of breast cancer resistant to anti-HER2 therapy. *Clin Cancer Res* 2012;**18**:2603–12.
185. Nahta R, Yuan LXH, Zhang B *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;**65**:11118–28.
186. Huang X, Gao L, Wang S *et al.* Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-i receptor in breast cancer cells resistant to herceptin. *Cancer Res* 2010;**70**:1204–14.
187. Henjes F, Bender C, von der Heyde S *et al.* Strong EGFR signaling in cell line models of ERBB2-amplified breast cancer attenuates response towards ERBB2-targeting drugs. *Oncogenesis* 2012;**1**:e16.
188. Gayle SS, Arnold SLM, O'Regan RM *et al.* Pharmacologic inhibition of mTOR improves lapatinib sensitivity in HER2-overexpressing breast cancer cells with primary trastuzumab resistance. *Anticancer Agents Med Chem* 2012;**12**:151–62.
189. Wang L, Yu X, Dong J *et al.* Combined SRC inhibitor saracatinib and anti-ErbB2 antibody H2-18 produces a synergistic antitumor effect on trastuzumab-resistant breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;**479**:563–70.
190. Arsuaga J, Borrman T, Cavalcante R *et al.* Identification of Copy Number Aberrations in Breast Cancer Subtypes Using Persistence Topology. *Microarrays* 2015;**4**:339–69.
191. Han S, Park K, Shin E *et al.* Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *Oncol Rep* 2010;**24**:121–8.
192. Malamou-Mitsi VD, Syrrou M, Georgiou I *et al.* Analysis of chromosomal aberrations in breast cancer by comparative genomic hybridization (CGH). Correlation with histoprognostic variables and c-erbB-2 immunoexpression. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;**18**:357–61.
193. Silva MP, Barros-Silva JD, Ersvær E *et al.* Prostate Cancer Prognosis Defined by the Combined Analysis of 8q, PTEN and ERG. *Transl Oncol* 2016;**9**:575–82.
194. Walker LC, McDonald M, Wells JE *et al.* Dual-Color Fluorescence In Situ Hybridization Reveals an Association of Chromosome 8q22 but Not 8p21 Imbalance with High Grade Invasive Breast Carcinoma. Aziz SA (ed.). *PLoS One* 2013;**8**:e70790.

195. Yokota T, Yoshimoto M, Akiyama F *et al.* Frequent multiplication of chromosomal region 8q24.1 associated with aggressive histologic types of breast cancers. *Cancer Lett* 1999;**139**:7–13.
196. Ben-David U, Ha G, Khadka P *et al.* The landscape of chromosomal aberrations in breast cancer mouse models reveals driver-specific routes to tumorigenesis. *Nat Commun* 2016;**7**:12160.
197. Rennstam K, Jönsson G, Tanner M *et al.* Cytogenetic characterization and gene expression profiling of the trastuzumab-resistant breast cancer cell line JIMT-1. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;**172**:95–106.
198. Bergamaschi A, Kim YH, Wang P *et al.* Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;**45**:1033–40.
199. Han S, Park K, Shin E *et al.* Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *Oncol Rep* 2010;**24**:121–8.
200. Parris TZ, Kovács A, Hajizadeh S *et al.* Frequent MYC coamplification and DNA hypomethylation of multiple genes on 8q in 8p11-p12-amplified breast carcinomas. *Oncogenesis* 2014;**3**:e95.
201. Sefrioui D, Vermeulin T, Blanchard F *et al.* Copy number variations in *DCC*/18q and *ERBB2*/17q are associated with disease-free survival in microsatellite stable colon cancer. *Int J Cancer* 2017;**140**:1653–61.
202. Liang J-W, Shi Z-Z, Zhang T-T *et al.* Analysis of genomic aberrations associated with the clinicopathological parameters of rectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Oncol Rep* 2013;**29**:1827–34.
203. Klatte T, Kroeger N, Rampersaud EN *et al.* Gain of chromosome 8q is associated with metastases and poor survival of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2012;**118**:5777–82.
204. Zafarana G, Ishkanian AS, Malloff CA *et al.* Copy number alterations of c-MYC and PTEN are prognostic factors for relapse after prostate cancer radiotherapy. *Cancer* 2012;**118**:4053–62.
205. El Gammal AT, Bruchmann M, Zustin J *et al.* Chromosome 8p Deletions and 8q Gains are Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2010;**16**:56–64.
206. Sircoulomb F, Bekhouche I, Finetti P *et al.* Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer* 2010;**10**:539.
207. Ping Z, Xia Y, Shen T *et al.* A microscopic landscape of the invasive breast cancer genome. *Sci Rep* 2016;**6**:27545.

208. Wade MA, May FEB, Onel K *et al.* Does radiation-induced *c-MYC* amplification initiate breast oncogenesis? *Mol Cell Oncol* 2016;**3**:e1010950.
209. Sahin O, Fröhlich H, Löbke C *et al.* Modeling ERBB receptor-regulated G1/S transition to find novel targets for de novo trastuzumab resistance. *BMC Syst Biol* 2009;**3**:1.
210. Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E *et al.* Assessment of Cardiac Dysfunction in a Randomized Trial Comparing Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel, With or Without Trastuzumab As Adjuvant Therapy in Node-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Overexpressing Breast Cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2005;**23**:7811–9.
211. Dueck AC, Reinholz MM, Geiger XJ *et al.* Impact of *c-MYC* protein expression on outcome of patients with early-stage HER2+ breast cancer treated with adjuvant trastuzumab NCCTG (alliance) N9831. *Clin Cancer Res* 2013;**19**:5798–807.
212. Pereira CBL, Leal MF, Abdelhay ESFW *et al.* MYC Amplification as a Predictive Factor of Complete Pathologic Response to Docetaxel-based Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2016, DOI: 10.1016/j.clbc.2016.12.005.
213. Kurosumi M, Tabei T, Sano M *et al.* Relationship between the signal ratios of HER-2/CEP17 and *c-MYC*/CEP17 and the pathological response of neoadjuvant therapy using docetaxel and trastuzumab in breast cancer. *Mol Med Rep* **1**:71–5.
214. Fan J, Shan C, Kang H-B *et al.* Tyr Phosphorylation of PDP1 Toggles Recruitment between ACAT1 and SIRT3 to Regulate the Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Mol Cell* 2014;**53**:534–48.
215. Shan C, Kang H-B, Elf S *et al.* Tyr-94 phosphorylation inhibits pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 and promotes tumor growth. *J Biol Chem* 2014;**289**:21413–22.
216. Chen S-T, Pan T-L, Juan H-F *et al.* Breast Tumor Microenvironment: Proteomics Highlights the Treatments Targeting Secretome. *J Proteome Res* 2008;**7**:1379–87.
217. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA *et al.* Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 2013;**13**:759–71.
218. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;**4**:540–50.
219. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI *et al.* The role of cytokines in breast cancer development and progression. *J Interferon Cytokine Res* 2015;**35**:1–16.
220. Müller A, Homey B, Soto H *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;**410**:50–6.
221. Fertig EJ, Lee E, Pandey NB *et al.* Analysis of gene expression of secreted factors associated with breast cancer metastases in breast cancer subtypes. *Sci Rep* 2015;**5**:12133.
222. Korkaya H, Kim G-I, Davis A *et al.* Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell* 2012;**47**:570–84.

223. Youngs SJ, Ali SA, Taub DD *et al.* Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *Int J cancer* 1997;**71**:257–66.
224. Luboshits G, Shina S, Kaplan O *et al.* Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res* 1999;**59**:4681–7.
225. Stormes KA, Lemken CA, Lepre J V *et al.* Inhibition of metastasis by inhibition of tumor-derived CCL5. *Breast Cancer Res Treat* 2005;**89**:209–12.
226. Swamydas M, Ricci K, Rego SL *et al.* Mesenchymal stem cell-derived CCL-9 and CCL-5 promote mammary tumor cell invasion and the activation of matrix metalloproteinases. *Cell Adh Migr* 2013;**7**:315–24.
227. Yi EH, Lee CS, Lee J-K *et al.* STAT3-RANTES Autocrine Signaling Is Essential for Tamoxifen Resistance in Human Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 2013;**11**:31–42.
228. Murooka TT, Rahbar R, Plataniias LC *et al.* CCL5-mediated T-cell chemotaxis involves the initiation of mRNA translation through mTOR/4E-BP1. *Blood* 2008;**111**:4892–901.
229. Wang S-W, Wu H-H, Liu S-C *et al.* CCL5 and CCR5 interaction promotes cell motility in human osteosarcoma. *PLoS One* 2012;**7**:e35101.
230. Chen R, Lee WY-W, Zhang XH *et al.* Epigenetic Modification of the CCL5/CCR1/ERK Axis Enhances Glioma Targeting in Dedifferentiation-Reprogrammed BMSCs. *Stem cell reports* 2017, DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.01.016.
231. Kato T, Fujita Y, Nakane K *et al.* CCR1/CCL5 interaction promotes invasion of taxane-resistant PC3 prostate cancer cells by increasing secretion of MMPs 2/9 and by activating ERK and Rac signaling. *Cytokine* 2013;**64**:251–7.
232. Yasuhara R, Irié T, Suzuki K *et al.* The β -catenin signaling pathway induces aggressive potential in breast cancer by up-regulating the chemokine CCL5. *Exp Cell Res* 2015;**338**:22–31.
233. Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H *et al.* Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001;**7**:285–9.
234. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC *et al.* Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Carboplatin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive and Triple-Negative Primary Breast Cancers. *J Clin Oncol* 2015;**33**:983–91.
235. Guarneri V, Dieci M V., Frassoldati A *et al.* Prospective Biomarker Analysis of the Randomized CHER-LOB Study Evaluating the Dual Anti-HER2 Treatment With Trastuzumab and Lapatinib Plus Chemotherapy as Neoadjuvant Therapy for HER2-Positive Breast Cancer. *Oncologist* 2015;**20**:1001–10.
236. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* 2007;**12**:9–22.

237. Andre F, Campone M, O'Regan R *et al.* Phase I Study of Everolimus Plus Weekly Paclitaxel and Trastuzumab in Patients With Metastatic Breast Cancer Pretreated With Trastuzumab. *J Clin Oncol* 2010;**28**:5110–5.
238. Hurvitz SA, Andre F, Jiang Z *et al.* Combination of everolimus with trastuzumab plus paclitaxel as first-line treatment for patients with HER2-positive advanced breast cancer (BOLERO-1): a phase 3, randomised, double-blind, multicentre trial. *Lancet Oncol* 2015;**16**:816–29.
239. Hurvitz SA, Dalenc F, Campone M *et al.* A phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2013;**141**:437–46.
240. André F, O'Regan R, Ozguroglu M *et al.* Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;**15**:580–91.
241. Andre F, Hurvitz S, Fasolo A *et al.* Molecular Alterations and Everolimus Efficacy in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Metastatic Breast Cancers: Combined Exploratory Biomarker Analysis From BOLERO-1 and BOLERO-3. *J Clin Oncol* 2016;**34**:2115–24.
242. O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B *et al.* mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;**66**:1500–8.
243. Wong H, Leung R, Kwong A *et al.* Integrating Molecular Mechanisms and Clinical Evidence in the Management of Trastuzumab Resistant or Refractory HER-2+ Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* 2011;**16**:1535–46.
244. Wilson-Edell KA, Yevtushenko MA, Rothschild DE *et al.* mTORC1/C2 and pan-HDAC inhibitors synergistically impair breast cancer growth by convergent AKT and polysome inhibiting mechanisms. *Breast Cancer Res Treat* 2014;**144**:287–98.
245. Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J *et al.* Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2008;**7**:1851–63.
246. Serra V, Scaltriti M, Prudkin L *et al.* PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene* 2011;**30**:2547–57.
247. Zhu Y, Tian T, Zou J *et al.* Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 exerts extensive antitumor activity in HER2-positive gastric cancer. *BMC Cancer* 2015;**15**:894.
248. Eichhorn PJA, Gili M, Scaltriti M *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase Hyperactivation Results in Lapatinib Resistance that Is Reversed by the mTOR/Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res* 2008;**68**:9221–30.

249. Serra V, Markman B, Scaltriti M *et al.* NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res* 2008;**68**:8022–30.
250. Nagy P, Friedländer E, Tanner M *et al.* Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005;**65**:473–82.
251. Kozloski GA, Carraway CAC, Carraway KL. Mechanistic and signaling analysis of Muc4-ErbB2 signaling module: New insights into the mechanism of ligand-independent ErbB2 activity. *J Cell Physiol* 2010;**224**:649–57.
252. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J *et al.* Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;**118**:3065–74.
253. Lou H-Z, Weng X-C, Pan H-M *et al.* The novel mTORC1/2 dual inhibitor INK-128 suppresses survival and proliferation of primary and transformed human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;**450**:973–8.

Anexos

Anexo 1

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido recogidos parcialmente en la siguiente publicación:

Generation, characterization, and maintenance of trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer cell lines. Zazo S, González-Alonso P, Martín-Aparicio E, Chamizo C, Cristóbal I, Arpí O, Rovira A, Albanell J, Eroles P, Lluch A, Madoz-Gúrpide J, Rojo F. Am J Cancer Res. 2016 Nov 1;6(11):2661-2678.

Además, se han publicado los siguientes artículos en los que el doctorando ha participado:

1. **Colon cancer modulation by a diabetic environment: A single institutional experience.** Prieto I, Del Puerto-Nevado L, Gonzalez N, Portal-Nuñez S, Zazo S, Corton M, Minguez P, Gomez-Guerrero C, Arce JM, Sanz AB, Mas S, Aguilera O, Alvarez-Llamas G, Esbrit P, Ortiz A, Ayuso C, Egido J, Rojo F, Garcia-Foncillas J; DiabetesCancerConnect Consortium. PLoS One. 2017 Mar 2;12(3):e0172300.
2. **The role of miR-26a and miR-30b in HER2+ breast cancer trastuzumab resistance and regulation of the CCNE2 gene.** Tormo E, Adam-Artigues A, Ballester S, Pineda B, Zazo S, González-Alonso P, Albanell J, Rovira A, Rojo F, Lluch A, Eroles P. Sci Rep. 2017 Jan 25;7:41309.
3. **CIP2A confirms its prognostic value in triple-negative breast cancer.** Cristóbal I, Zazo S, Torrejón B, Pedregal M, Madoz-Gúrpide J, Lluch A, Eroles P, Rovira A, Albanell J, García-Foncillas J, Rojo F. Oncogene. 2017 Jan 9.
4. **Recent Insights into the Development of Preclinical Trastuzumab-Resistant HER2+ Breast Cancer Models.** González-Alonso P, Cristóbal I, Zazo S, Martín-Aparicio E, Chamizo C, Madoz-Gúrpide J, Rovira A, Eroles P, Lluch A, Albanell J, Rojo F. Curr Med Chem. 2016 Dec 16. [Epub ahead of print]
5. **c-Jun N-Terminal Kinase Inactivation by Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 Determines Resistance to Taxanes and Anthracyclines in Breast Cancer.** Rincón R, Zazo S, Chamizo C, Manso R, González-Alonso P, Martín-Aparicio E, Cristóbal I, Cañadas C, Perona R, Lluch A, Eroles P, García-Foncillas J, Albanell J, Rovira A, Madoz-Gúrpide J, Rojo F. Mol Cancer Ther. 2016 Nov;15(11):2780-2790. Epub 2016 Sep 6.

6. **Non-canonical NF- κ B pathway activation predicts outcome in borderline oestrogen receptor positive breast carcinoma.** Rojo F, González-Pérez A, Furriol J, Nicolau MJ, Ferrer J, Burgués O, Sabbaghi M, González-Navarrete I, Cristobal I, Serrano L, Zazo S, Madoz J, Servitja S, Tusquets I, Albanell J, Lluch A, Rovira A, Eroles P. Br J Cancer. 2016 Jul 26;115(3):322-31.
7. **Vitamin C uncouples the Warburg metabolic switch in KRAS mutant colon cancer.** Aguilera O, Muñoz-Sagastibelza M, Torrejón B, Borrero-Palacios A, Del Puerto-Nevado L, Martínez-Useros J, Rodríguez-Remirez M, Zazo S, García E, Fraga M, Rojo F, García-Foncillas J. Oncotarget. 2016 Jul 26;7(30):47954-47965.
8. **Thymidylate synthase expression as a predictive biomarker of pemetrexed sensitivity in advanced non-small cell lung cancer.** Chamizo C, Zazo S, Dómine M, Cristóbal I, García-Foncillas J, Rojo F, Madoz-Gúrpide J. BMC Pulm Med. 2015 Oct 26;15:132. doi: 10.1186/s12890-015-0132-x.
9. **Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer.** Madoz-Gúrpide J, Zazo S, Chamizo C, Casado V, Caramés C, Gavín E, Cristóbal I, García-Foncillas J, Rojo F. J Transl Med. 2015 Aug 29;13:282.
10. **Pyrosequencing-Based Assays for Rapid Detection of HER2 and HER3 Mutations in Clinical Samples Uncover an E332E Mutation Affecting HER3 in Retroperitoneal Leiomyosarcoma.** González-Alonso P, Chamizo C, Moreno V, Madoz-Gúrpide J, Carvajal N, Daoud L, Zazo S, Martín-Aparicio E, Cristóbal I, Rincón R, García-Foncillas J, Rojo F. Int J Mol Sci. 2015 Aug 17;16(8):19447-57.
11. **Nuclear DICKKOPF-1 as a biomarker of chemoresistance and poor clinical outcome in colorectal cancer.** Aguilera Ó, González-Sancho JM, Zazo S, Rincón R, Fernández AF, Tapia O, Canals F, Morte B, Calvanese V, Orgaz JL, Niell N, Aguilar S, Freije JM, Graña O, Pisano DG, Borrero A, Martínez-Useros J, Jiménez B, Fraga MF, García-Foncillas J, López-Otín C, Lafarga M, Rojo F, Muñoz A. Oncotarget. 2015 Mar 20;6(8):5903-17.
12. **PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects.** Rincón R, Cristóbal I, Zazo S, Arpí O, Menéndez S, Manso R, Lluch A, Eroles P, Rovira A, Albanell J, García-Foncillas J, Madoz-Gúrpide J, Rojo F. Oncotarget. 2015 Feb 28;6(6):4299-314.

13. **DEK is a potential marker for aggressive phenotype and irinotecan-based therapy response in metastatic colorectal cancer.** Martinez-Useros J, Rodriguez-Remirez M, Borrero-Palacios A, Moreno I, Cebrian A, Gomez del Pulgar T, del Puerto-Nevado L, Vega-Bravo R, Puime-Otin A, Perez N, Zazo S, Senin C, Fernandez-Aceñero MJ, Soengas MS, Rojo F, Garcia-Foncillas J. BMC Cancer. 2014 Dec 16;14:965
14. **Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer.** Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Caramés C, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Clin Cancer Res. 2015 Jan 15;21(2):347-56.
15. **Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition enhances trastuzumab antitumour activity in HER2 overexpressing breast cancer.** García-Parra J, Dalmases A, Morancho B, Arpí O, Menendez S, Sabbaghi M, Zazo S, Chamizo C, Madoz J, Eroles P, Servitja S, Tusquets I, Yelamos J, Lluch A, Arribas J, Rojo F, Rovira A, Albanell J. Eur J Cancer. 2014 Oct;50(15):2725-34.
16. **Regulatory and functional connection of microphthalmia-associated transcription factor and anti-metastatic pigment epithelium derived factor in melanoma.** Fernández-Barral A, Orgaz JL, Baquero P, Ali Z, Moreno A, Tiana M, Gómez V, Riveiro-Falkenbach E, Cañadas C, Zazo S, Bertolotto C, Davidson I, Rodríguez-Peralto JL, Palmero I, Rojo F, Jensen LD, del Peso L, Jiménez B. Neoplasia. 2014 Jun;16(6):529-42.
17. **Phosphorylated protein phosphatase 2A determines poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer.** Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Zazo S, Del Pulgar TG, Cebrián A, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Br J Cancer. 2014 Aug 12;111(4):756-62.
18. **Clinical significance of miR-126 in colorectal cancer.** Cristóbal I, Aguilera O, García-Foncillas J, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F. Genes Chromosomes Cancer. 2014 Oct;53(10):881. doi: 10.1002/gcc.22192. Epub 2014 Jun 4.
19. **Active angiogenesis in metastatic renal cell carcinoma predicts clinical benefit to sunitinib-based therapy.** del Puerto-Nevado L, Rojo F, Zazo S, Caramés C, Rubio G, Vega R, Chamizo C, Casado V, Martínez-Useros J, Rincón R, Rodríguez-Remírez M, Borrero-Palacios A, Cristóbal I, Madoz-Gúrpide J, Aguilera O, García-Foncillas J. Br J Cancer. 2014 May 27;110(11):2700-7.

20. **PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential.** Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Senin C, Borrero A, Martínez-Useros J, Rodríguez M, Zazo S, Aguilera O, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Mol Cancer Ther. 2014 Apr;13(4):938-47.
21. **Gene expression profiling in true interval breast cancer reveals overactivation of the mTOR signaling pathway.** Rojo F, Domingo L, Sala M, Zazo S, Chamizo C, Menendez S, Arpi O, Corominas JM, Bragado R, Servitja S, Tusquets I, Nonell L, Macià F, Martínez J, Rovira A, Albanell J, Castells X. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014 Feb;23(2):288-99.
22. **Targeting epithelial-to-mesenchymal transition with Met inhibitors reverts chemoresistance in small cell lung cancer.** Cañadas I, Rojo F, Taus Á, Arpi O, Arumí-Uría M, Pijuan L, Menéndez S, Zazo S, Dómine M, Salido M, Mojal S, García de Herreros A, Rovira A, Albanell J, Arriola E. Clin Cancer Res. 2014 Feb 15;20(4):938-50.
23. **Basement membrane-rich organoids with functional human blood vessels are permissive niches for human breast cancer metastasis.** Fernández-Periáñez R, Molina-Privado I, Rojo F, Guijarro-Muñoz I, Alonso-Camino V, Zazo S, Compte M, Alvarez-Cienfuegos A, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Alvarez-Méndez AM, Sanz L, Alvarez-Vallina L. PLoS One. 2013 Aug 8;8(8):e72957. doi: 10.1371/journal.pone.0072957. eCollection 2013.
24. **Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer.** Rojo F, García-Parra J, Zazo S, Tusquets I, Ferrer-Lozano J, Menendez S, Eroles P, Chamizo C, Servitja S, Ramírez-Merino N, Lobo F, Bellosillo B, Corominas JM, Yelamos J, Serrano S, Lluch A, Rovira A, Albanell J. Ann Oncol. 2012 May;23(5):1156-64.
25. **DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer.** Moncho-Amor V, Ibañez de Cáceres I, Bandres E, Martínez-Poveda B, Orgaz JL, Sánchez-Pérez I, Zazo S, Rovira A, Albanell J, Jiménez B, Rojo F, Belda-Iniesta C, García-Foncillas J, Perona R. Oncogene. 2011 Feb 10;30(6):668-78.